

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C07K 14/025, C12N 15/86, A61K 39/12</b>		<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/03885</b>
			(43) Date de publication internationale: 28 janvier 1999 (28.01.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01576</p> <p>(22) Date de dépôt international: 17 juillet 1998 (17.07.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97/09152 18 juillet 1997 (18.07.97) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): KIENY, Marie-Paule [FR/FR]; 6, allée des Platanes, F-67100 Strasbourg (FR). BALLOUL, Jean-Marc [FR/FR]; 12, rue des Alouettes, F-67380 Lingolsheim (FR). BIZOUARNE, Nadine [FR/FR]; 5, rue de Mutzig, F-67300 Schiltigheim (FR).</p> <p>(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(54) Title: ANTITUMORAL COMPOSITION BASED ON IMMUNOGENIC POLYPEPTIDE WITH MODIFIED CELL LOCATION</p> <p>(54) Titre: COMPOSITION ANTITUMORALE A BASE DE POLYPEPTIDE IMMUNOGENE DE LOCALISATION CELLULAIRE MODIFIEE</p>			
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns an antitumoral composition comprising as therapeutic agent one or several immunogenic polypeptides, of which at least one is modified so as to have a cell location different from its native location. The invention also concerns a composition based on a recombinant vector expressing said immunogenic polypeptide. It further concerns a recombinant vector comprising at least the sequences coding for an immunogenic polypeptide originating from a precocious and/or tardive region of a papillomavirus having a modified location and a viral particle comprising said vector. Finally it concerns the therapeutic use of said composition, said recombinant vector and said viral particle.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne une composition antitumorale comprenant à titre d'agent thérapeutique un ou plusieurs polypeptides immunogènes, dont l'un au moins est modifié de manière à présenter une localisation cellulaire différente de sa localisation native. Elle concerne également une composition à base de vecteur recombinant exprimant ledit polypeptide immunogène. Elle a également pour objet un vecteur recombinant comprenant au moins les séquences codant pour un polypeptide immunogène originaire d'une région précoce et/ou tardive d'un papillomavirus modifié au niveau de sa localisation ainsi qu'une particule virale comprenant ledit vecteur. Enfin, elle concerne l'utilisation thérapeutique de la composition, du vecteur recombinant et de la particule virale selon l'invention.</p>			

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Biélorus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**Composition antitumorale à base de polypeptide immunogène de  
localisation cellulaire modifiée**

5

La présente invention a pour objet une composition antitumorale comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un polypeptide immunogène modifié de manière à présenter une localisation différente de sa localisation native. Elle  
10 concerne également une composition à base de vecteur recombinant exprimant ledit polypeptide. Une telle composition est plus particulièrement destinée au traitement ou la prévention des lésions associées aux papillomavirus.

Il est généralement admis que le cancer est une maladie qui résulte d'une perte du contrôle de la multiplication cellulaire. Ses causes peuvent être multiples et  
15 dues notamment à un dysfonctionnement de gènes cellulaires (activation par exemple par mutation somatique de gènes potentiellement oncogènes ; dérégulation de l'expression ; inhibition de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs) ou à l'expression indésirable de gènes viraux.

Chez l'homme, les papillomavirus (HPV) sont associés à des pathologies  
20 allant de l'infection bénigne de la peau, aux verrues et aux tumeurs malignes. Parmi les 75 types de HPV identifiés jusqu'à présent, 20 isolats distincts sont hautement spécifiques des voies génitales et 5 d'entre eux (HPV-16 et 18 et à un moindre degré les HPV-31, 33 et 45) sont clairement associés au cancer du col de l'utérus et des voies basses. Toute une série d'études démontre le rôle transformant de ces virus,  
25 leur intégration spécifique dans le génome des cellules néoplasiques, leur activité génique dans les cellules cancéreuses et l'importance de l'expression de certains gènes viraux dans le maintien du phénotype malin des cellules néoplasiques HPV positives (Monsenego, J. Impact Medecin, 11 mars 1994).

D'une manière générale, les papillomavirus sont des virus à ADN possédant  
30 un génome circulaire d'environ 7900 paires de bases entouré par une capside

protéique. Un certain nombre de types de papillomavirus, notamment bovins (BPV) et humains (HPV) ont été identifiés (Pfister, 1987, in *The papovaviridae : The Papillomaviruses*, édition Salzman et Howley, Plenum Press, New York, p 1-38). Leur génome comprend une région précoce contenant les cadres de lecture E1, E2, E4, E5, E6 et E7 et une région tardive codant pour les protéines de capsid L1 et L2.

Les protéines précoces ont la capacité de lier l'ADN et sont trouvées de manière prédominante dans le noyau. Les produits d'expression E1 et E2 régulent la réplication virale et l'expression des gènes viraux alors que ceux des régions E5, E6 et E7 sont impliqués dans les processus de transformation oncogénique des cellules infectées. A cet égard, il a été montré expérimentalement que la protéine E5 de BPV-1 peut *in vitro* transformer des cellules (Schlegel et al., 1986, Science 233, 464-467). Le pouvoir transformant de E7 a été démontré pour HPV-16 et HPV-18 (Kanda et al., 1988, J. Virol. 62, 610-613 ; Vousden et al., 1988, Oncogene Res. 3, 1-9 ; Bedell et al., 1987, J. Virol. 61, 3635-3640) et corrélé à sa capacité à lier le produit du gène du rétinoblastome (Rb) (Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105 ; Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446). Par ailleurs, Crook et al. (1991, Cell 67, 547-556) ont montré que l'antigène E6 de HPV-16 et 18 peut complexer le produit du gène p53, ce qui explique son rôle prédominant dans la transformation cellulaire.

Les pathologies associées aux virus HPV posent un problème thérapeutique du fait de leur nature persistante et récurrente. Même si les approches classiques demeurent la chirurgie et la chimiothérapie, l'immunothérapie est maintenant envisagée pour le traitement de ces maladies. Le candidat vaccin idéal doit, à titre préventif (immunoprophylaxie), empêcher l'infection de s'établir durablement et de se propager aux tissus voisins et, à titre curatif (immunothérapie), réduire l'évolution tumorale chez les patientes infectées. On a proposé jusqu'à présent d'utiliser les antigènes de capsid pour induire la production d'anticorps contre les épitopes localisés à la surface des particules virales et les protéines précoces pour établir l'immunité cellulaire à l'encontre des cellules infectées après intégration de l'ADN

viral.

A cet égard, le brevet européen EP 0 462 187 décrit une approche thérapeutique par administration de poxvirus exprimant les gènes précoces des papillomavirus. L'approche de vaccination décrite dans WO 93/02184 est basée sur  
5 l'utilisation des antigènes de capsid à titre d'agents immunogènes et notamment de particules virales vides d'ADN (VLP pour Virus like particles) reconstituées *in vitro*. La demande française 96 09584 divulgue une composition associant l'effet préventif procuré par les polypeptides précoces et l'effet curatif conféré par les polypeptides tardifs des papillomavirus. Or, jusqu'à présent, on a mis en oeuvre les protéines  
10 virales, éventuellement mutées de manière à abolir leur activité transformante, mais néanmoins natives du point de vue de leur localisation cellulaire.

La présente invention se propose d'utiliser des protéines immunogènes dont la localisation a été modifiée dans le but d'améliorer leur accessibilité au système immunitaire de l'hôte, afin d'améliorer ou stimuler une réponse immunitaire à l'égard de  
15 la tumeur ou du cancer à traiter, que celle-ci soit spécifique ou non spécifique et de type humoral (production d'anticorps) ou cellulaire (réponse cytotoxique CTL).

On a maintenant modifié les antigènes nucléaires E6 et E7 de HPV-16 par introduction de séquences d'ancrage et de sécrétion appropriées afin de leur conférer une présentation transmembranaire. Le changement de localisation a un effet  
20 bénéfique sur la réponse immunitaire qui se traduit par une activité antitumorale supérieure chez les animaux traités avec un virus de la vaccine co-exprimant les antigènes E6 et E7 membranaires et l'IL-2 humaine, comparé à ceux ayant reçu un virus équivalent produisant les antigènes nucléaires. Le but de la présente invention est de mettre à la disposition du public des compositions antitumorales plus efficaces  
25 que les compositions de l'art antérieur, pour inhiber au moins partiellement l'établissement ou la progression d'une tumeur ou d'un cancer. Une application particulièrement utile est le traitement des infections à HPV et plus particulièrement des pathologies graves telles que le cancer du col de l'utérus.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet une composition  
30 antitumorale comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un ou

plusieurs polypeptide(s) immunogène(s), l'un au moins desdits polypeptides étant modifié de manière à présenter une localisation différente de sa localisation native.

Au sens de la présente invention, le terme "polypeptide immunogène" désigne un polypeptide qui ne trouve pas son équivalent dans les cellules normales.

- 5 Un exemple préféré est constitué par un antigène tumeur-spécifique. Pour illustrer, on peut citer les antigènes cellulaires dont l'expression survient pendant la période foeto-embryonnaire et régresse à la naissance jusqu'à disparaître, les antigènes qui s'expriment normalement à un très faible niveau et qui, exprimés à fort niveau, deviennent caractéristiques d'une tumeur, les antigènes cellulaires dont la structure  
10 ou la conformation est modifiée ou encore les antigènes non cellulaires, en particulier viraux dérivant d'un virus oncogène. Il peut s'agir par exemple des produits d'expression des gènes BRCA-1 (Miki et al., 1994, Science 226, 66-71), BRCA-2 (Wooster et al., 1995, Nature 378, 789-792), MUC-1 (Hareuveni et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9498-9502), CEA..., dont certaines mutations ou la  
15 surexpression sont impliquées dans le développement cancéreux. Pour ce qui est des antigènes viraux, on peut citer plus particulièrement les produits d'expression des gènes précoces ou tardifs des papillomavirus, EBNA-1 du virus Epstein Barr, les antigènes des virus HTLV (Human T Lymphocyte Virus) I et II ou des virus de l'hépatite B et C. Les antigènes spécifiques de tumeurs sont largement décrits dans  
20 la littérature accessible à l'homme de l'art

- La caractéristique essentielle du polypeptide en usage dans la présente invention est de présenter une localisation différente de sa localisation native. Les mécanismes de transport et les signaux impliqués sont décrits dans les ouvrages de biologie cellulaire (voir par exemple Molecular Biology of the Cell, Third Ed.  
25 Garland Publishing Inc. NY & London). Brièvement, la grande majorité des polypeptides est synthétisée sur des ribosomes libres dans le cytosol où ils exercent leur activité. Mais, certains polypeptides ont une destination cellulaire autre, généralement déterminée par la présence de signaux peptidiques appropriés et doivent être transportés jusqu'à celle-ci. Ainsi, les polypeptides destinés à être  
30 exportés vers la membrane plasmique ou sécrétés à l'extérieur de la cellule sont

synthétisés par des ribosomes associés au réticulum endoplasmique (RE) généralement sous forme de précurseurs comportant à leur extrémité amino-terminale une séquence de sécretion (ou peptide signal) qui initie leur passage dans le RE. Elle est ensuite éliminée par une endopeptidase spécifique pour donner le

5 polypeptide mature. Une séquence de sécretion comporte habituellement 15 à 35 acides aminés essentiellement hydrophobes. Il n'existe pas de séquence consensuelle et il semble que ce soit la structure secondaire qui détermine la reconnaissance par l'endopeptidase. Néanmoins, le clivage protéolytique a lieu le plus souvent après un résidu glycine, sérine ou alanine.

10 Les protéines membranaires comportent généralement une séquence d'ancrage de nature fortement hydrophobe qui reste insérée dans la membrane plasmique. Le polypeptide peut être transmembranaire avec l'une de ses extrémités exposée à l'extérieur de la cellule, la séquence d'ancrage traversant la membrane et l'autre extrémité du côté cytosolique. Dans la plupart des cas, la chaîne

15 polypeptidique imbriquée dans la double couche lipidique de la membrane a une conformation en hélice  $\alpha$  (voir par exemple Branden et Tooze, 1991, dans Introduction to Protein Structure p 202-214, NY Garland).

Quant à la localisation nucléaire, elle peut être conférée par la présence d'une courte séquence dite de localisation nucléaire (NLS) composée principalement de

20 résidus chargés positivement, tels que lysine et arginine. On peut citer à titre d'exemples les signaux de translocation nucléaire KRKKRK et RKRRKR présents dans les polypeptides L1 et L2 de HPV (Zhou et al., 1991, Virology 185, 625-632). Cependant, certains polypeptides exerçant leur fonction au sein du noyau ne possèdent pas de séquence NLS typique. C'est le cas des antigènes E6 et E7 de

25 papillomavirus.

Le polypeptide immunogène compris dans la composition selon l'invention peut résulter de l'introduction et/ou la délétion de signaux de localisation appropriés au sein d'un polypeptide natif, d'un fragment de celui-ci, d'une chimère comportant des séquences d'origines différentes ou d'un variant (délétion, insertion et/ou

30 substitution d'un ou plusieurs acides aminés). De manière plus particulière, sa

séquence en acides aminés présente un degré de similarité avec tout ou partie de la séquence du polypeptide natif dont il est issu supérieur à 70 %, avantageusement, supérieur à 80 % et, de préférence, supérieur à 90 %. Le degré de similarité peut être aisément calculé à l'aide d'un programme ordinateur approprié ou en alignant les séquences de manière à obtenir le degré maximal d'homologie et en comptabilisant le nombre de positions dans lesquelles les acides aminés des deux séquences se retrouvent à l'identique par rapport au nombre total de positions.

L'homme du métier connaît les signaux permettant le changement de présentation cellulaire d'un polypeptide. Dans le cas où l'on désire que le polypeptide immunogène soit sécrété, l'adjonction d'une séquence de sécretion à son extrémité amino-terminale, permettra son transport via le RE vers l'extérieur de la cellule hôte. L'insertion a lieu de préférence immédiatement en aval du codon initiateur de la traduction. Dans le cadre de la présente invention, il peut être avantageux de muter/déléter tout ou partie des résidus déterminant la localisation native, pour éviter les interférences. Par exemple, si le polypeptide natif a une destination membranaire, il comporte d'ores et déjà une séquence de sécretion et on procédera éventuellement à la mutation ou délétion de la séquence d'ancrage hydrophobe. En outre, l'inactivation (par mutation/délétion) des signaux natifs peut permettre une localisation cytoplasmique. La présentation cytoplasmique d'un peptide immunogène présentant normalement une localisation cellulaire différente (par exemple nucléaire, membranaire, sécrétée ...) peut favoriser la présentation peptidique médiée par les antigènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité et la réponse CTL *in vivo* (Tobery et Siliciano, 1997, J. Exp. Med. 5, 909-920). Un autre mode de réalisation envisageable consiste à fusionner le polypeptide immunogène avec l'ubiquitine également dans le but de stimuler une réponse CTL puissante.

Avantageusement, une composition selon l'invention comprend un polypeptide immunogène modifié de manière à présenter une localisation membranaire, de préférence, par insertion d'une séquence d'ancrage membranaire et, dans le cas où le polypeptide natif en est dépourvu, d'une séquence de sécretion. Le site d'insertion préféré de la séquence de sécretion est l'extrémité N-terminale,



comme indiqué précédemment, et celui de la séquence d'ancrage membranaire est l'extrémité C-terminale, par exemple immédiatement en amont du codon stop. Dans ce contexte, il peut également être avantageux de procéder à la mutation/délétion de tout ou partie des signaux de localisation natifs (par exemple séquence NLS) pour  
5 ne pas interférer avec la nouvelle localisation.

Le choix du signal de localisation susceptible d'être mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention est vaste. Il peut dériver de toute protéine en comportant d'origine eucaryote ou non (virus, parasite, champignon ....) du moment qu'il soit reconnu par la cellule à traiter. Il peut être naturel ou synthétique,  
10 hétérologue ou homologue vis à vis de cette dernière. Il peut également comporter une ou plusieurs modifications par rapport au signal dont il dérive, sous réserve qu'elle(s) n'affecte(nt) pas sa fonction. A titre indicatif, on préférera avoir recours aux séquences de sécretion et/ou d'ancrage membranaire de la glycoprotéine rabique, de la glycoprotéine env du virus HIV ou de la protéine F du virus de la rougeole.  
15 Dans le cas où la modification du polypeptide immunogène fait intervenir plusieurs signaux de localisation (par exemple séquence de sécretion et d'ancrage membranaire), ceux-ci peuvent avoir une origine commune ou différente.

Il est également possible de mettre en oeuvre des signaux de localisation ciblant un compartiment cellulaire particulier. On peut citer notamment une séquence  
20 consensus d'endocytose (par exemple celle présente dans la région C-terminale des chaînes lourdes d'immunoglobuline IgG1 de séquence IPNYRNM ; Kaisho et al., 1997, Science 276, 412-414) ou une séquence permettant le ciblage dans la membrane de l'appareil de Golgi (Mochamer et Rose, 1987, J. Cell Biol. 105, 1205-1214 ; Mochamer, 1993, Curr. Opin. Cell Biol. 5, 606-612). On peut notamment  
25 envisager l'emploi de séquences dérivées de la glycoprotéine E1 de Coronavirus divulguées dans la banque de données Swiss-Prot sous l'accèsion P11222. L'incorporation de ce type de séquence à l'extrémité C-terminale du polypeptide immunogène est préférée.

Par ailleurs, la modification de la localisation cellulaire peut être réalisée par  
30 toute technique conventionnelle, notamment par mutagenèse dirigée, ligation de

signaux exogènes ou PCR.

Selon un mode de réalisation préféré, une composition antitumorale selon l'invention, est destinée à traiter ou prévenir les infections à papillomavirus et les désordres en résultant, en particulier les dysplasies du col de bas grade et le cancer du col de l'utérus. Selon ce mode de réalisation, elle comprend au moins un polypeptide immunogène originaire d'une région précoce et/ou tardive d'un papillomavirus, notamment d'un virus à risque tel que HPV-16, 18, 31, 33 ou encore 45.

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, on peut mettre en oeuvre un ou plusieurs polypeptides immunogènes de papillomavirus quels qu'ils soient. Comme rappelé précédemment, leur génome code pour 8 polypeptides, deux polypeptides tardifs L1 et L2 composant la capsid virale et 6 polypeptides précoces (E1, E2, E4, E5, E6 et E7) impliqués dans la régulation, le maintien du génome viral et la transformation des cellules infectées.

S'agissant d'un polypeptide immunogène de type précoce, on choisit avantageusement de mettre en oeuvre un polypeptide dérivant de E6 ou de E7, modifié notamment de manière à présenter une localisation membranaire. Etant donné les observations rappelées plus haut sur le pouvoir transformant, on a de préférence recours à un variant non oncogène muté au niveau de la région impliquée dans le processus de transformation cellulaire. De tels variants sont décrits dans la littérature (Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105 ; Crook et al., 1991, Cell 67, 547-556 ; Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446 ; Phelps et al., 1992, J. Virol. 66, 2418-2427). Un polypeptide immunogène convenant particulièrement aux fins de la présente invention, est l'antigène E6 de HPV-16 délété des résidus 111 à 115 (+1, représentant le premier acide aminé de l'antigène viral natif) et fusionné aux signaux de sécrétion et d'ancrage de la protéine F du virus de la rougeole (SEQ ID NO: 1). On peut également utiliser l'antigène E7 de HPV-16 délété des résidus 22 à 25 et fusionné aux séquences d'ancrage et de sécrétion de la glycoprotéine rabique (SEQ ID NO: 2).

La composition antitumorale selon l'invention peut également comprendre

un polypeptide immunogène originaire de la région tardive d'un papillomavirus, dérivant de L1 ou L2.

Bien entendu, la composition antitumorale selon l'invention peut comprendre plusieurs polypeptides immunogènes, dont l'un au moins présente une localisation  
5 cellulaire différente de sa localisation native. On peut citer pour illustrer une composition associant plusieurs polypeptides dérivés de papillomavirus, ceux-ci pouvant avoir une origine commune ou différente (par exemple HPV-16 et 18 dans le but d'élargir le spectre d'action). Une composition combinant plusieurs polypeptides d'origine précoce permettra d'améliorer l'effet thérapeutique. La  
10 combinaison des polypeptides dérivés de L1 et L2 pourrait avoir un effet bénéfique sur les propriétés préventives de la composition. Enfin, une composition qui convient tout particulièrement aux buts poursuivis par la présente invention comprend au moins un polypeptide précoce et au moins un polypeptide tardif de papillomavirus afin de combiner l'effet préventif et curatif. Selon un mode préféré, l'un au moins des  
15 polypeptides immunogènes d'origine précoce est modifié de manière à présenter une localisation membranaire par adjonction de séquences de sécretion et d'ancrage telles que celles citées auparavant.

A cet égard, une composition préférée selon l'invention comprend :

- (1) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou  
20 identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1,
- (2) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
- (3) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou  
25 identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1 et un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
- (4) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou  
30 identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la

- protéine L2 d'un papillomavirus,
- (5) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus, ou
- (6) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus.

Le terme «homologue» fait référence à un degré d'identité avec ladite séquence supérieure à 70 %, avantageusement supérieur à 80 %, de préférence, supérieure à 90 % et, de manière tout à fait préférée, supérieur à 95 %.

Avantageusement, une composition antitumorale selon l'invention peut comprendre en outre au moins un composé améliorant son effet antitumoral, dans le but d'augmenter l'intensité de la réponse immunitaire spécifiquement ou non.

Outre les adjuvants, les immunostimulateurs représentent des composés particulièrement préférés. Par "immunostimulateur", on entend un composé ayant la capacité de renforcer une réponse immunitaire humorale afin d'amplifier la production d'anticorps dirigés contre le polypeptide immunogène ou à médiation cellulaire, afin de déclencher une réponse cytotoxique significative à l'encontre des cellules tumorales ou infectées. A titre indicatif, l'immunostimulation peut être évaluée en modèle animal cancéreux par comparaison du taux de rejet dans un animal traité avec le polypeptide immunogène, ceci en présence et en absence de l'immunostimulateur. D'une manière plus générale, les moyens pour mettre en évidence une immunostimulation sont indiqués dans Roitt (*Immunology*, 4th edition, Moby Ltd). Un des avantages d'une telle composition est qu'elle combine l'immunité

spécifique induite par le polypeptide immunogène et l'immunité aspécifique induite par la molécule immunostimulatrice.

Dans le cadre de la présente invention, on peut utiliser un immunostimulateur natif, notamment d'origine humaine, une partie de celui-ci, une chimère provenant de la fusion de séquences d'origines diverses ou encore un mutant, à la condition toutefois de conserver la fonction immunostimulatrice. Parmi toutes les molécules envisageables, on préférera mettre en oeuvre un immunostimulateur choisi parmi l'interleukine-2, l'interleukine-7, l'interleukine-12 et les molécules de co-adhésion B7.1 et B7.2. On indique que l'interleukine-2 et la molécule B7.1 sont particulièrement préférées.

D'une manière générale, les polypeptides immunogènes et immunostimulateurs peuvent être produits par les méthodes conventionnelles de synthèse chimique ou bien par les techniques de l'ADN recombinant (voir par exemple Maniatis et al., 1989, *Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Plus particulièrement, un procédé de préparation comprend l'acte de cultiver une cellule transformée par un fragment d'ADN codant pour le polypeptide en question pour générer une cellule productrice et l'acte de récolter ledit polypeptide à partir de la culture. La cellule productrice peut être d'une origine quelconque et sans limitation, une bactérie, une levure ou bien une cellule de mammifère, dans la mesure où le fragment d'ADN considéré est soit intégré dans son génome soit intégré dans un vecteur d'expression approprié. Bien entendu, le fragment d'ADN est placé sous le contrôle de signaux de transcription et de traduction permettant son expression dans la cellule productrice. Vecteurs d'expression et signaux de contrôle sont connus de l'homme du métier.

La présente invention vise également une composition antitumorale comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique au moins un vecteur recombinant comprenant les séquences codant pour un ou plusieurs polypeptides immunogènes, l'un au moins desdits polypeptides étant modifié de manière à présenter une localisation différente de sa localisation native et, éventuellement, pour un composé améliorant l'effet antitumoral. Ce type de composition présente

l'avantage d'une production bon marché et d'une grande stabilité dans des conditions d'environnement variées. En particulier, les conditions de conservation sont moins contraignantes. Les polypeptides ont les caractéristiques telles que définies ci-avant.

Les séquences codant pour le polypeptide immunogène ou améliorant l'effet  
5 antitumoral peuvent être obtenues par clonage, par PCR (Polymerase Chain Réaction) ou par synthèse chimique selon les techniques conventionnelles communément en usage et à partir des données de la littérature. Pour ce qui est du mode de réalisation préféré, les séquences codant pour les polypeptides de papillomavirus peuvent être isolées à partir de cellules papillomavirus positives  
10 obtenues de patients ou de collections. L'insertion des signaux de localisation appropriés peut être réalisée par les techniques de biologie moléculaire. Les séquences codant pour l'immunostimulateur peuvent être clonées à partir de l'ADN cellulaire ou des ARN messagers d'une cellule dans laquelle il est exprimé. L'homme du métier est capable de générer les sondes ou amorces appropriées à partir des  
15 données publiées. On indique que la séquence nucléotidique des génomes HPV-16 et 18 est divulguée dans Genbank aux numéros d'accension K02718 et X05015 respectivement. La séquence du gène humain IL-2 est décrite dans le brevet français 85 09480 et dans Taniguchi et al. (1983, *Nature* 302, 305-311) et celle codant pour l'antigène B7.1 dans Freeman et al. (1989, *J. of Immunology* 143, 2714-2722).

20 Un vecteur utilisable dans le cadre de l'invention peut être plasmidique ou viral, dérivé notamment d'un poxvirus, d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus de l'herpès ou d'un virus associé à l'adénovirus. Avantageusement, il s'agira d'un vecteur non-intégratif et d'une virulence atténuée. De tels vecteurs ainsi que leurs techniques de préparation sont connus de l'homme de l'art.

25 Dans le cas où l'on met en oeuvre un vecteur adénoviral, on aura de préférence recours à un vecteur non replicatif par délétion de régions essentielles à la replication et, notamment, de la majorité de la région E1 afin d'éviter sa propagation au sein de l'organisme hôte ou l'environnement. Il va de soi que l'on peut modifier ou déléter d'autres régions du génome adénoviral, notamment au sein  
30 des régions E2, E4 et/ou L1-L5, dans la mesure où les fonctions essentielles

défectives sont complémentées en *trans*. Pour illustrer ces modes de réalisation, on peut citer la mutation thermosensible affectant le gène DBP (pour DNA Binding Protein en anglais) de la région E2A (Ensinger et al., 1972, J. Virol. 10, 328-339). Une délétion partielle de la région E4 à l'exception des séquences codant pour les cadres de lecture ouverts (ORF) 6 et 7 est également envisageable (Ketner et al., 1989, Nucleic Acids Res. 17, 3037-3048). Une autre possibilité est la délétion totale de l'unité transcriptionnelle E4. Par ailleurs, le vecteur adénoviral selon l'invention peut être dépourvu de tout ou partie de la région non essentielle E3. Selon cette alternative, il peut être intéressant de conserver néanmoins les séquences E3 codant pour les polypeptides permettant l'échappement au système immunitaire de l'hôte, notamment la glycoprotéine gp19k (Gooding et al., 1990, Critical Review of Immunology 10, 53-71). Un vecteur adénoviral préféré selon l'invention retiendra au minimum les séquences essentielles à l'encapsulation, à savoir les ITRs (Inverted Terminal Repeat) 5' et 3' et la région d'encapsulation. On indique qu'il peut dériver d'un adénovirus humain ou animal et d'un sérotype quelconque. Les adénovirus humains du sous groupe C et notamment les adénovirus 2 (Ad2) et 5 (Ad5) conviennent tout particulièrement à la mise en oeuvre de l'invention. Les différents vecteurs adénoviraux ainsi que leurs techniques de préparation sont conventionnels et sont décrits dans Graham et Preveet (1991, in *Methods in Molecular Biology*, vol 7, p 109-128 ; Ed : E.J. Murey, The Human Press Inc.) et dans la demande internationale WO 94/28152. Par exemple, il peut être généré *in vitro* dans *Escherichia coli* (*E.coli*) par ligation ou recombinaison homologue (voir par exemple la demande internationale W096/17070) ou encore par recombinaison dans une lignée de complémentation.

S'il s'agit d'un rétrovirus, on conserve les LTRs (Long Terminal Repeat) et les séquences d'encapsulation (voir par exemple Naviaux et Verma, 1992, Current Opinion in Biotechnology 3, 540-547). La séquence codant pour le(s) polypeptide(s) immunogène(s) peut être placée sous le contrôle du LTR rétroviral ou d'un promoteur interne tels que ceux décrits ci-après. Il peut dériver d'un rétrovirus d'une origine quelconque (murin, primate, félin, humain etc...) et en particulier du

MoMuLV (Moloney murine leukemia virus), MVS (Murine sarcoma virus) ou Friend murine retrovirus (Fb29). Il peut également comporter des modifications notamment au niveau des LTR (remplacement de la région promotrice par un promoteur eucaryote) ou de la région d'encapsidation (remplacement par une région  
5 d'encapsidation hétérologue, par exemple de type VL30) (voir les demandes françaises 94 08300 et 97 05203).

Selon un mode de réalisation avantageux, un vecteur recombinant selon l'invention dérive d'un poxvirus et, notamment, d'un poxvirus aviaire, tel que le poxvirus du canari, d'un fowlpox ou d'un virus de la vaccine, ce dernier étant  
10 préféré. Parmi tous les virus de la vaccine envisageables dans le cadre de la présente invention, on choisit de préférence les souches Copenhagen, Wyeth et Ankara modifiée (MVA pour Modified Vaccinia Virus Ankara).

Généralement, le site d'insertion est choisi dans une région non essentielle à la réplication de sorte que les capacités de réplication et propagation du virus  
15 recombinant ne sont pas altérées. A titre indicatif, lorsque l'on utilise un virus de la souche Copenhagen, le site d'insertion préféré est le locus TK, ce qui a pour effet d'inactiver celui-ci et ainsi faciliter la sélection des recombinants. On peut également utiliser le locus K1L. Pour ce qui est d'un virus MVA, l'insertion des séquences recombinantes (immunogènes et immunostimulatrices) peut être réalisée au sein de  
20 l'une au moins des excisions I à VI et, notamment II ou III (Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038 ; Sutter et al., 1994, Vaccine 12, 1032-1040). L'insertion peut également avoir lieu dans une région virale essentielle, comme la région D4R, la fonction défective pouvant être fournie *en trans* par exemple par le biais d'une lignée de complémentation.

25 Bien entendu, dans le cadre de la présente invention, les séquences codant pour le polypeptide immunogène ou améliorant l'effet antitumoral sont placées sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte. Ceux-ci incluent les éléments de régulation de la transcription ainsi que des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction. Parmi eux, le  
30 promoteur revêt une importance particulière. D'une façon générale, on aura recours



à un promoteur fonctionnel dans l'organisme ou la cellule hôte que l'on veut traiter et adapté au vecteur employé. En outre, il peut être modifié de manière à contenir des séquences régulatrices, par exemple un élément activateur de la transcription ou des séquences répondant à certains signaux cellulaires. A cet égard, il peut être  
5 avantageux d'utiliser un promoteur tissu-spécifique puisque les lésions associées aux papillomavirus sont localisées au niveau des voies génitales ou un promoteur répondant à des signaux spécifiquement tumoraux (par exemple activé en présence de facteurs de croissance généralement surexprimés par les cellules tumorales) afin de limiter l'expression aux seules cellules tumorales.

10 Parmi les promoteurs envisageables dans le cadre de l'invention, on peut citer les promoteurs SV40 (Virus Simian 40), HMG (Hydroxy-Methyl-Glutaryl-coenzyme A), TK (Thymidine Kinase), CMV (cytomégalovirus), RSV (Rous Sarcoma Virus), MLP (Major Late Promoter) adapté au vecteur adénoviraux et le LTR du Mo-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) plus spécifique des vecteurs rétroviraux. Le  
15 promoteur précoce du Cytomégalovirus (CMV) est tout particulièrement préféré. Il peut également s'agir d'un promoteur stimulant l'expression dans une cellule tumorale ou cancéreuse. On peut citer notamment les promoteurs des gènes MUC-1 surexprimé dans les cancers du sein et de la prostate (Chen et al., 1995, J. Clin. Invest. 96, 2775-2782), tyrosinase surexprimé dans les mélanomes (Vile et al., 1993,  
20 Cancer Res. 53, 3860-3864) et ERB-2 surexprimé dans les cancers du sein et du pancréas (Harris et al., 1994, Gene Therapy 1, 170-175). Les promoteurs en question sont décrits dans la littérature et peuvent être clonés à partir du génome cellulaire ou viral par les techniques classiques.

S'agissant d'un vecteur poxviral, on aura recours à un promoteur pox, par  
25 exemple 7,5K, H5R, TK, p.28, p.11 ou encore K1L du virus de la vaccine. Un promoteur synthétique convient également à la mise en oeuvre de la présente invention (voir par exemple Chakrabarti et al., 1997, Biotechniques 23, 1094-1097 ; Hammond et al., 1997, J. Virological Methods 66, 135-138 et Kumar et Boyle, 1990, Virology 179, 151-158). A cet égard, il s'agit avantageusement d'un  
30 promoteur chimère entre un promoteur tardif et un promoteur précoce.

Par ailleurs, les éléments nécessaires à l'expression peuvent également comporter des séquences améliorant l'expression ou le maintien dans la cellule hôte (intron, séquence terminatrice de la transcription, site d'initiation de la traduction...). Cependant, dans le cas d'un vecteur poxviral, on évitera l'emploi d'introns.

5 Une composition selon l'invention peut comprendre un seul ou plusieurs vecteurs recombinants exprimant les séquences correspondant aux polypeptides choisis placés, sous le contrôle d'éléments indépendants ou communs. Selon cette dernière option, on peut avoir recours à des séquences permettant d'initier la traduction de manière interne (IRES) ou à des fusions en phase des différents gènes.

10 Les conditions générales d'obtention d'un vecteur recombinant en usage dans la présente invention sont largement décrites dans l'état de la technique. S'agissant d'un vecteur poxviral, on peut se référer au brevet européen EP 83 286 dont le contenu est ici incorporé par référence. Ces conditions sont applicables aux autres virus acceptables comme vecteur qui possèdent une région génomique dans laquelle  
15 les blocs d'expression peuvent être incorporés. Bien entendu, ils peuvent être insérés dans le même locus ou un locus différent.

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, un vecteur recombinant peut en outre comprendre un bloc d'expression d'un gène marqueur de sélection afin de faciliter les étapes d'isolement et de purification du virus  
20 recombinant. On peut citer notamment le gène *neo* conférant la résistance à l'antibiotique G418, le gène *pac* de résistance à la puromycine, le gène TK du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) qui confère la sensibilité à certains analogues de nucléosides tels que le ganciclovir ou l'acyclovir, le gène *gpt* (xanthine guanine phosphoribosyl transférase), les gènes bactériens *LacZ* codant pour la  $\beta$ -galactosidase et *gus A* codant pour la  $\beta$ -glucuronidase. Ces deux derniers marqueurs  
25 enzymatiques permettent de repérer les virus recombinants par coloration en présence des substrats X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) et XglcA (5-bromo-6-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide) respectivement.

30 Une composition antitumorale préférée est destinée au traitement ou la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus, et comprend au moins un

virus de la vaccine de la souche Copenhague ou MVA dans lequel sont insérées :

- (1) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1,
- 5 (2) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
- (3) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1 et pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
- 10 (4) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus,
- 15 (5) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un pour polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus, ou
- 20 (6) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus.
- 25
- 30 Ladite composition peut également comprendre les séquences codant pour

un immunostimulateur de préférence choisi parmi L'IL-2 ou B7.1. Il peut être porté par l'un des vecteurs recombinants permettant l'expression du ou des gènes immunogènes ou par un vecteur indépendant.

Une composition selon l'invention peut être préparée selon les procédés connus dans le domaine des vaccins et les doses applicables peuvent varier dans une large gamme. Elles sont fonctions notamment des polypeptides et du vecteur employés, de la pathologie à traiter, de l'état du patient et d'autres paramètres qui peuvent être évalués par le clinicien. Cependant, en général, la dose de virus sera de  $10^4$  à  $10^{13}$ , avantageusement de  $10^5$  à  $10^{12}$  et, de préférence de  $10^5$  à  $10^9$  unités formant des plages (ufp) lorsque l'agent thérapeutique est un vecteur viral et de 0,05 à 500 mg, avantageusement de 0,5 à 200 mg et, de préférence de 1 à 100 mg lorsque l'agent thérapeutique est d'origine polypeptidique.

Une composition selon l'invention peut être administrée selon n'importe quelle voie conventionnelle d'administration, de préférence systémique et en particulier par voie intramusculaire, intraveineuse, intrapulmonaire, sous-cutanée ou sous-épithéliale ou bien par scarification. Dans le cas d'une tumeur accessible, il est également possible de recourir à une injection directe dans le site ou à proximité de la tumeur ou à une application topicale. A titre de vaccin, une composition selon l'invention peut être administrée selon les pratiques courantes dans le domaine, par exemple en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. Par contre dans le cadre d'un traitement curatif, elle peut être administrée fréquemment pendant une période suffisante pour que le traitement soit efficace. Lorsque l'agent thérapeutique est un vecteur viral, le virus est de préférence sous forme vivante. S'agissant d'un vecteur poxviral, on préférera employer une souche atténuée comme la souche MVA ou la souche Copenhague thymidine kinase négative. Enfin un vecteur viral recombinant peut être atténué par un traitement chimique approprié connu de l'homme du métier. Toutefois, on peut aussi envisager d'injecter un vecteur recombinant tué.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré, une composition antitumorale selon l'invention comprend une quantité thérapeutiquement efficace de l'agent

thérapeutique en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Le support est choisi de manière à permettre son administration par injection à l'homme ou à l'animal. Elle peut également comprendre un véhicule, un diluant et/ou un adjuvant et se présenter sous forme liquide ou lyophilisée. A cet

5    égard, l'association à une ou plusieurs substances susceptibles d'améliorer l'efficacité transfectionnelle et/ou la stabilité du vecteur peut être envisagée. Ces substances sont largement documentées dans la littérature accessible à l'homme de l'art (voir par exemple Felgner et al., 1989, Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115-121 ; Hodgson et Solaiman, 1996, Nature Biotechnology 14, 339-342 ; Remy et al.,

10   1994, Bioconjugate chemistry 5, 647-654). A titre illustratif et non limitatif, il peut s'agir de polymères, de lipides notamment cationiques, de liposomes, de protéines nucléaires et de lipides neutres. Une combinaison envisageable est un vecteur plasmidique associé à des lipides cationiques (DC-Chol, DOGS ... etc) et des lipides neutres (DOPE). La composition peut également être associée à d'autres

15   substances, notamment anti-cancéreuses, celles-ci pouvant être administrées séparément ou de façon concomitante. Le ligand Flt3 est un exemple parmi d'autres (Lynch et al., 1997, Nature Medicine 3, 625 ; Brasel et al., 1996, Blood 88, 2004-2012 ; Marakovsky et al., 1996, J. Exp. Med. 184, 1953-1962). On indique que la composition peut être sous forme de pseudoparticules lorsqu'elle comprend les

20   polypeptides L1 et/ou L2.

La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant comprenant au moins les séquences codant pour un polypeptide immunogène originaire d'une région précoce et/ou tardive d'un papillomavirus, ledit polypeptide ayant les caractéristiques définies ci-avant. Il peut en outre porter d'autres séquences

25   d'intérêt, par exemple codant pour un ou plusieurs autres peptides immunogènes et/ou immunostimulateurs, tels que décrits auparavant.

Le choix d'un vecteur selon l'invention est large. Il peut s'agir d'un vecteur plasmidique ou viral tel que ceux cités ci-dessus. Un mode de réalisation préféré consiste en un vecteur poxviral et tout particulièrement un virus de la vaccine de la

30   souche Copenhague ou MVA. Les sites d'insertion et les éléments nécessaires à

l'expression des séquences d'intérêt à exprimer peuvent être choisis parmi ceux mentionnés précédemment.

Un vecteur préféré est un virus de la vaccine de la souche Copenhague ou MVA dans lesquels sont insérées :

- 5 (1) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1,
- (2) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
- 10 (3) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1 et pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
- 15 (4) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus,
- 20 (5) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus, ou
- 25 (6) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, pour un polypeptide immunogène dérivant
- 30

de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus.

Il peut de manière optionnelle également inclure les séquences codant pour l'IL2 ou le polypeptide B7.1

5           La présente invention concerne également une particule virale préparée à partir d'un vecteur viral recombinant selon l'invention. S'agissant d'un vecteur adénoviral, les particules virales peuvent être générées par transfection du vecteur dans une cellule de complémentation adaptée à ses déficiences. On aura par exemple recours à la lignée 293 établie à partir de cellules de rein embryonnaire humain, qui  
10           complémente efficacement la fonction E1 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72), la lignée A549-E1 (Imler et al., 1996, Gene Therapy 3, 75-84) ou une lignée permettant une double complémentation (Yeh et al., 1996, J. Virol. 70, 559-565 ; Krougliak et Graham, 1995, Human Gene Therapy 6, 1575-1586 ; Wang et al., 1995 Gene Therapy 2, 775-783 ; demande internationale WO 97/04119). Par cellule de  
15           complémentation, on entend une cellule capable de compléter *en trans* un vecteur défectif pour générer une particule virale. Ladite cellule peut ne pas compléter à elle seule toutes les fonctions défectives du vecteur et dans ce cas on peut avoir recours à un virus auxiliaire pour une complémentation partielle. La particule virale peut être récupérée du surnageant de culture mais également des  
20           cellules. Une des méthodes couramment employée consiste à lyser les cellules par des cycles consécutifs de congélation/décongélation pour recueillir les virions dans le surnageant de lyse. Ceux-ci peuvent être amplifiés et purifiés selon les techniques de l'art (procédé chromatographique, ultracentrifugation notamment à travers un gradient de chlorure de césium ...).

25           Une particule rétrovirale peut être obtenue par transfection du vecteur rétroviral dans une lignée appropriée, par exemple une lignée capable de fournir *en trans* les polypeptides viraux gag, pol et/ou env dont les séquences sont délétées / non fonctionnelles dans le vecteur. De telles lignées sont décrites dans la littérature (PA317, Psi CRIP GP + Am-12 etc...)

30           S'agissant d'un vecteur poxviral, les conditions générales d'obtention d'un

virus de la vaccine capable d'exprimer un gène hétérologue sont enseignées dans le brevet européen EP 83 286 et la demande EP 206 920. Quant au virus MVA, il est plus particulièrement décrit dans Mayr et al. (1975, Infection 3, 6-14) et Sutter et Moss (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10847-10851). Brièvement, le(s)  
5 gène(s) à transférer placé(s) sous le contrôle des éléments appropriés pour son (leur) expression *in vivo* est (sont) inséré(s) dans un vecteur de transfert incluant des séquences virales de part et d'autre du site d'insertion. Il est introduit dans des cellules infectées par un virus de la vaccine infectieux. Le gène recombinant est intégré dans le génome viral par recombinaison homologue entre les séquences  
10 homologues du virus infectieux et du vecteur de transfert.

Le vecteur recombinant ou la particule virale peut être éventuellement associé à une ou plusieurs substances améliorant l'efficacité transfectionnelle et/ou la stabilité du vecteur déjà citées.

Dans le cadre de la présente invention, ledit polypeptide immunogène peut  
15 être ancré dans la structure protéique entourant la particule virale (capside, enveloppe...).

Les poxvirus sont des structures complexes entourées par de multiples membranes. Deux types de particules virales sont produites : les virions matures intracellulaires (IMV) et les virions enveloppés extracellulaires (EEV). La surface  
20 des IMV est composée de 2 membranes superposées et l'enveloppe des EEV consiste en 4 membranes incluant la membrane plasmique. Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, les séquences codant pour le polypeptide immunogène peuvent également être modifiées en vue d'une insertion dans l'une ou l'autre des membranes poxvirales (IMV ou EEV) dans le but d'améliorer la réponse  
25 immune. Selon un mode de réalisation avantageux, le peptide immunogène est ancré dans la membrane externe de l'enveloppe d'une particule EEV (Katz et al. 1997, AIDS Res. Hum. Retrov. 13, 1497-1500). Pour ce faire, les séquences codant pour la partie C-terminale de la protéine B5R, constituant protéique de ladite membrane externe, sont insérées en 3' de la région codante du polypeptide immunogène juste  
30 en amont du codon STOP. Un exemple tout à fait préféré est une fusion entre le



polypeptide E7 ou un de ses mutants non oncogènes et les 42 résidus C-terminaux de la protéine B5R. L'effet bénéfique sur la réponse immune peut être évalué par des études d'immunoprophylaxie et d'immunothérapie selon le protocole décrit dans les exemples qui suivent comparant les différentes formulations (localisation native, ancrage dans la membrane cellulaire, ancrage dans la membrane virale).

La présente invention concerne également l'utilisation d'une composition antitumorale, d'un vecteur recombinant ou d'une particule virale selon l'invention, pour la préparation d'un médicament pour le traitement ou la prévention du cancer ou de tumeurs et, en particulier du cancer du col de l'utérus, d'une dysplasie du col de bas grade ou d'une infection à papillomavirus. L'utilisation préférée est pour la préparation d'un médicament injectable par la voie intramusculaire.

Enfin, la présente invention a également trait à une méthode de traitement ou de prévention des pathologies citées ci-dessus, selon laquelle on administre à un individu ayant besoin d'un tel traitement une quantité efficace d'un point de vue pharmaceutique d'une composition antitumorale, d'un vecteur recombinant ou d'une particule virale selon l'invention.

La présente invention est illustrée par référence aux figures suivantes.

La Figure 1 est une représentation schématique de pTG8042. BRG3 et BRD3 représentent les bras de recombinaison gauche et droit permettant l'insertion au niveau de la zone d'excision III du virus MVA. pTG8042 comprend une cassette d'expression du gène E6 de HPV16 fusionné à la séquence signal (SF) et la région transmembranaire (TMF) de la protéine F du virus de la rougeole, dirigé par le promoteur 7.5k ; une cassette d'expression du gène IL-2 placé sous le contrôle du promoteur pH5R ; une cassette d'expression du gène E7 de HPV16 fusionné à la séquence signal (SR) et la région transmembranaire (TMR) de la glycoprotéine rabique, placé sous le contrôle du promoteur p7.5 et une cassette d'expression du gène *gusA* (*uidA*) placé sous le contrôle du promoteur p7.5

La Figure 2 est une représentation schématique du vecteur pTG9936. BRG3

et BRD3 représentent les bras de recombinaison gauche et droit permettant l'insertion au niveau de la zone d'excision III du génome MVA. Le pTG9936 porte le promoteur p4BK1L dirigeant l'expression du gène marqueur *gpt* le promoteur p4BK1L dirigeant l'expression du gène L2 de HPV16, le promoteur pH5R dirigeant l'expression de l'IL-2, le promoteur p11k7.5 dirigeant l'expression du gène L1 de HPV16, le promoteur p7.5 dirigeant l'expression du gène E7 de HPV16 fusionné à la séquence signal (SR) et la région transmembranaire (TMR) de la glycoprotéine du virus rabique suivi d'une séquence IRES et du gène E6 de HPV16 fusionné à la séquence signal (SF) et la région transmembranaire (TMF) de la protéine F du virus de la rougeole.

La Figure 3 illustre l'expérience N121 en présentant le pourcentage de survie en fonction du temps (en jours) des animaux vaccinés avant épreuve tumorale avec le virus MVATG8042, MVATG6090, MVAN33 ou avec du PBS.

La Figure 4 représente le pourcentage d'animaux sans tumeurs en fonction du temps (en jours) après administration de  $10^7$ ,  $10^6$  ou  $10^5$  pfu de virus MVAN33 ou MVATG8042 (expérience N127).

La Figure 5 illustre l'expérience N134 en présentant le pourcentage de survie en fonction du temps (en jours) des animaux traités par le virus MVATG8042 ou par le contrôle MVAN33 par scarification, voie sous-cutanée (SC), intrapéritonéale (IP) et intramusculaire (IM).

## EXEMPLES

La présente invention est plus complètement décrite, sans pour autant être limitée, à l'aide des exemples suivants.

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, *supra*) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. La mutagenèse dirigée *in vitro* par oligonucléotides synthétiques est effectuée à l'aide du kit distribué par Amersham. Les techniques d'amplification par

PCR sont connues de l'homme de l'art (voir par exemple PCR Protocols-A guide to methods and applications, 1990, édité par Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press Inc). S'agissant de la réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow). En ce qui concerne les étapes de clonage, les bactériophages M13 recombinants sont multipliés sur la souche *E. coli* NM522 (Stratagène) dans un milieu minimum gélosé (agar 7,5 %) ou dans un milieu riche LBM liquide. Les plasmides recombinants portant le gène de résistance à l'ampicilline sont répliqués dans les souches *E. coli* C600 (Stratagène), BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580) et NM522 sur milieu gélosé ou liquide supplémenté de 100 µg/ml d'antibiotique. On utilise préférentiellement la souche BJ5183 lorsque le clonage est effectué par recombinaison homologue (Bubeck et al., 1993, Nucleic Acid Res. 21, 3601-3602).

La construction des virus de la vaccine recombinants est effectuée selon la technologie classique dans le domaine divulguée dans les documents déjà cités et dans Mackett et al., (1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415-7419) et Mackett et al. (1984, J. Virol. 49, 857-864).

Les tests *in vivo* (immunoprophylaxie ou immunothérapie) sont réalisés sur des souris femelles C57Bl6 (C. Rivers Rouen, France) ou des souris nude (Janvier, Le Genest St. Isle, France) âgées de 6 à 8 semaines. Les animaux sont généralement répartis en groupes de 20 (sauf lorsqu'indiqué) selon les virus, la dose ou la voie d'administration à tester. Les cellules tumorales TC1 (Wu, John Hopkins University, Baltimore, USA) sont obtenues de cellules de poumon prélevées de souris C57 Bl6 transduites avec deux rétrovirus, l'un exprimant les gènes E6 et E7 natifs de HPV-16 et l'autre exprimant l'oncogène ras. Les cellules sont cultivées en milieu DMEM (Dubelcco Modified Eagles Medium) en présence de G418 (0,5 mg/ml). Les cellules sont utilisées pour l'épreuve animale après traitement à la trypsine et 3 lavages en milieu isotonique.

EXEMPLE 1 : Construction des vecteurs portant les séquences codant pour les

mutants non oncogènes de E6 et E7 de HPV-16 munis de  
signaux de localisation transmembranaire.

Les gènes E6 et E7 sont isolés à partir de la lignée cellulaire Caski comme  
5 décrit aux exemples 2 et 3 du brevet européen EP 0 462 187. Deux constructions  
ont été dérivées du clone M13E7/E6 contenant les gènes E6 et E7 du HPV-16 afin  
de faciliter les étapes ultérieures de clonage. La première désignée M13TG8188  
résulte de l'introduction par mutagenèse dirigée de sites *Pst*I et *Bam*HI  
respectivement en amont et en aval du gène E7 et la seconde, M13TG8189  
10 comporte un site *Pst*I en amont du gène E6. L'introduction de mutations ponctuelles  
en amont d'un ATG initiateur et en aval d'un codon stop sont à la portée de l'homme  
de l'art.

L'association de la protéine E7 de HPV-16 avec le produit du gène de  
rétinoblastome a été démontrée par divers auteurs (voir par exemple Munger et al.,  
15 1989, EMBO J. 8, 4099-4105) et corrélée à son pouvoir transformant. Pour des  
raisons évidentes de sécurité, on génère un mutant non oncogène délété des codons  
21 à 26 de la protéine E7 native impliqués dans la fonction de transformation, par  
mutagenèse dirigée du vecteur M13TG8188 à l'aide de l'oligonucléotide oTG5118  
(SEQ ID NO: 3). On obtient M13TG9104 portant le gène E7 muté, désigné ci-après.  
20 E7\*.

Les signaux de sécrétion et d'ancrage de la glycoprotéine rabique sont isolés  
du gène de la glycoprotéine rabique inséré sous forme d'un fragment *Bgl*II dans le  
pBR327 (pTG150 décrit dans le brevet français 83 15716) et sous cloné en vecteur  
M13 (M13TG177). On introduit entre ces signaux un site *Bam*HI en phase avec ces  
25 derniers par mutagenèse dirigée à l'aide de l'oligonucléotide oTG5745 (SEQ ID NO:  
4). La construction résultante est dénommée M13TG9128. Les séquences de  
sécrétion et d'ancrage sont ensuite isolées du M13TG9128 par digestion *Pst*I et  
insérées en 3' du promoteur naturel du virus de la vaccine p7.5 dans le vecteur  
pTG5003 linéarisé par *Pst*I, pour donner pTG5016. A titre indicatif, pTG5003  
30 dérive du pTG186poly (décrit dans le brevet français 2 583 429) par digestion *Sal*I,

traitement par le fragment Klenow, puis digestion par *Sma*I et religation, de sorte qu'il ne contient plus dans son polylinker que les sites *Pst*I et *Eco*RI à l'exclusion de tout autre. Le vecteur M13TG9104 est modifié par mutagenèse dirigée à l'aide des oligonucléotides oTG6390 et oTG6880 (SEQ ID NO: 5 et 6) afin de mettre en  
5 phase les séquences E7\* et les signaux de sécrétion et d'ancrage de la glycoprotéine rabique (désignées par la suite E7\*TMR). La construction résultante est dénommée M13TG9150.

De même, il a été démontré que la protéine E6 de HPV-16 pouvait interagir avec le produit d'expression du gène suppresseur de tumeur *p53* (Crook et al., 1991,  
10 Cell 67, 547-556). Le domaine impliqué dans cette interaction a clairement été défini et se situe entre les résidus 111 à 115 de la protéine native. Le vecteur M13TG9125 est généré par mutagenèse de M13TG8189 à l'aide de l'oligonucléotide oTG5377 (SEQ ID NO: 7). Le gène E6  $\lambda$ 111-115 est désigné ci-après E6\*.

Les signaux de sécrétion et d'ancrage de la protéine F du virus de la  
15 rougeole sont isolés par PCR à partir de la construction plasmidique pTG2148 (décrite dans le brevet européen EP 0 305 229) contenant l'ADN codant pour la protéine F du virus de la rougeole. La fusion entre ces séquences et celles codant pour E6\* est réalisée par PCR direct : la séquence de sécrétion est amplifiée à l'aide des oligonucléotides oTG10829 portant en 5' un site *Xba*I (SEQ ID NO: 8) et  
20 oTG10830 recouvrant l'extrémité 5' de E6 (SEQ ID NO: 9), les séquences codant pour le mutant E6\* sont amplifiées à partir du M13TG9125 à l'aide des oligonucléotides oTG10835 permettant la fusion avec l'extrémité 3' du signal de sécrétion de la protéine F (SEQ ID NO: 10) et oTG10836 permettant la fusion avec  
25 l'extrémité 5' de la séquence d'ancrage de la protéine F (SEQ ID NO: 11). Pour la séquence d'ancrage, on met en oeuvre les amorces oTG10833 permettant la fusion entre le 3' de E6\* et le 5' de la séquence d'ancrage (SEQ ID NO: 12) et oTG10834 créant en 3' les sites *Kpn*I et *Sph*I (SEQ ID NO: 13). Le fragment amplifié portant les séquences E6\* fusionnées en N et C terminal respectivement aux séquences de sécrétion et d'ancrage membranaire de la protéine F (désignées par la suite E6\*TMF)  
30 est digéré par *Xba*I et *Sph*I puis inséré aux mêmes sites dans le vecteur M13TG131

**EXEMPLE 2 : Construction du virus recombinant MVATG8042 exprimant les antigènes E6 et E7 de localisation transmembranaire et l'IL-2 humaine.**

Le virus MVA dérive de la souche du virus de la vaccine Ankara. Il n'est pas capable de générer des particules infectieuses sur les cellules de mammifères mais se développe correctement sur des fibroblastes embryonnaires de poulet. Son adaptation à ces cellules a provoqué l'excision de 6 régions non essentielles pour son développement et son cycle infectieux sur ce type de cellules (disparition d'environ 15 % du génome viral ; Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038). L'intégration de matériel génétique exogène peut être réalisée au niveau de l'une quelconque de ces zones d'excision. Dans le cadre de la présente invention, on utilise les excisions II et III localisées au niveau des fragments de restriction *Hind*III N et A respectivement (Altenburger et al., 1989, Arch. Virol. 105, 15-27).

Dans un premier temps, on construit le vecteur pTG6019 permettant l'insertion dans la zone d'excision III du virus MVA. Les bras de recombinaison homologue de part et d'autre de la zone d'excision III sont isolés par PCR à partir du génome viral (voir brevet américain US 5,185,146) et des amorces oTG7637 et oTG7638 (SEQ ID NO: 14 et 15) pour le bras gauche et oTG7635 et oTG7636 (SEQ ID NO: 16 et 17) pour le bras droit. Les fragments amplifiés sont clonés au site *EcoRI* du vecteur pTG1E, pour donner pTG6019. Le matériel génétique à transférer est inséré entre les deux bras de recombinaison. Le vecteur pTG1E est similaire au pTG1H (brevet français 2 583 429) mis à part la présence d'un adaptateur *EcoRI* à la place de sites multiples de clonage.

On insère en premier lieu une cassette d'expression du gène marqueur *gus A*. Le promoteur 7,5K est tout d'abord cloné dans le site *Bam*HI de pTG6019. On obtient pTG6021 dans le site *Bam*HI duquel on insère le gène *gus A* généré sous

forme d'un fragment *Bg*III-*Bam*HI. Celui-ci peut être obtenu à partir de la séquence divulguée dans la littérature. La construction résultante est dénommée pTG6022. La présence du marqueur va permettre de discriminer les virus sauvages des virus recombinants par détection de l'activité enzymatique GUS par le substrat XglcA.

5 Une coloration rouge révèle l'activité  $\beta$ -glucuronidase. Cependant, dans l'optique d'une application clinique, il peut être utile d'être en mesure d'éliminer ce marqueur bactérien du produit final après la sélection des virus recombinants. Pour ce faire, on met à profit la capacité de la vaccine à déléter les séquences comprises entre deux sites homologues. C'est pourquoi on insère un second promoteur p7,5K en aval du

10 gène *gus A* dans une orientation sens par rapport à celui qui dirige l'expression de ce dernier. Le vecteur pTG6025 résulte de l'insertion entre les sites *Bam*HI et *Sac*I de pTG6022 d'un fragment p7,5K muni d'extrémités cohésives.

Par ailleurs, l'ADNc codant pour l'interleukine-2 humaine est isolé du plasmide pTG36 (brevet français 2 583 770) par digestion *Pst*I et inséré dans le site

15 *Pst*I du plasmide pTG186 (brevet français 2 583 429), donnant lieu à pTG188. Le virus obtenu par recombinaison homologue est dénommé VVTG188. Après digestion *Bg*III/*Eco*RI, les séquences IL-2 sont insérées en 3' du promoteur naturel de la vaccine pH5R aux sites *Bam*HI/*Eco*RI du M13TG9132, pour donner M13TG9185. A titre indicatif, le vecteur M13TG9132 provient de l'insertion du

20 promoteur du gène H5R isolé par PCR du génome viral dans le phage M13TG6131, lequel dérive de M13TG131 (Kieny et al., 1983, *supra*) par mutation du site *Bg*III interne situé en dehors des sites multiples de clonage.

Les gènes HPV-16 et IL-2 sont ensuite clonés dans la zone d'excision III du génome du MVA. Les séquences E7\**TMR* sont isolées par digestion *Bg*III/*Hind*III

25 et insérées entre les sites *Bam*HI et *Hind*III du pTG6025 en 3' du promoteur vaccine p7.5. La construction résultante est dénommée pTG6050. Un site d'insertion de la cassette d'expression du gène de l'IL-2 humaine par recombinaison homologue est créé entre les sites *Hind*III et *Kpn*I du pTG6050 par insertion des oligonucléotides oTG10502 et oTG10503 (SEQ ID NO: 18 et 19). Le vecteur généré pTG6074 est

30 ensuite linéarisé par digestion *Hind*III/*Kpn*I et la recombinaison homologue avec la

cassette d'expression pH5R-IL-2 isolée du M13TG9185 par digestion *BglII/EcoRI* est réalisée. La construction résultante pTG6088 est finalement linéarisée par *KpnI* et mis en ligation avec le gène E6\*TMF isolé du M13TG9199 par digestion *KpnI/XbaI* et le promoteur p7.5 isolé du M13TG9136 par digestion *XbaI/KpnI*. La construction résultante est dénommée pTG8042 (Figure 1). Le vecteur M13TG9136 provient de M13TG5107 modifié par mutagenèse dirigée à l'aide des oTG5925 (création d'un site *PstI* en 3' du promoteur p7.5 ; SEQ ID NO: 20) et oTG5924 (création d'un site *BamHI* et *KpnI* en 5' du promoteur p7.5 ; SEQ ID NO: 21).

Le virus MVATG8042 est généré par recombinaison homologue avec le génome MVA selon les règles de l'art. L'isolement des recombinants est facilité par la présence du gène marqueur *gusA*.

On vérifie que la modification de localisation cellulaire des antigènes précoces de HPV ne nuit pas à leur expression. L'analyse par Western blot d'extraits cellulaires infectés par MVATG8042 à l'aide d'un anticorps anti-E7 permet la détection de 3 bandes d'un poids moléculaire compris entre 20 et 35 kDa. Cette hétérogénéité peut être expliquée par la présence d'un site potentiel de O-glycosylation dans la zone d'ancrage membranaire de la glycoprotéine rabique. Lorsque l'analyse Western blot est répétée en présence de Phényl-Gal-Nac (Phényl N-acétyl  $\alpha$  D galactopyranoside, Sigma, P4023), on ne détecte qu'une seule forme de 20 kDa ce qui confirme la O-glycosylation du produit d'expression du gène E7\*TMR.

La détection par Western blot à l'aide d'un anticorps anti E6 du produit d'expression du gène E6\*TMF ne met en évidence qu'une seule bande migrant au poids moléculaire attendu de 20 kDa, ce qui confirme l'absence de modifications post-traductionnelles. A titre indicatif, les anticorps anti-E6 et E7 précités sont des antisérum de lapins obtenus par administration de l'antigène purifié. Mais tout autre anticorps spécifique, qu'il soit monoclonal ou polyclonal, peut également convenir.

L'expression du gène hIL-2 est évaluée par ELISA (Quantikine R&D Systems) et test de prolifération cellulaire IL-2 dépendant. Selon les conditions de culture, la quantité d'IL-2 produite varie de 200 à 800 ng/ml/24 h par  $10^6$  cellules



infectées avec 0,1 pfu/cellule.

EXEMPLE 3 : Efficacité *in vivo* du virus MVATG8042 (immunothérapie).

5 Des souris C57BL6 sont inoculées avec  $10^3$  cellules BMK-16 myc implantées en voie sous-cutanée. A titre indicatif, la lignée cellulaire dérive de cellules de rein de souris nouveau-nées transfectées par le génome HPV-16 et le gène c myc murin.  $10^7$  pfu (unités formant des plages) de virus MVATG8042 sont ensuite administrés également en sous-cutanée à J3, J6 et J9 et l'évolution des tumeurs suivie régulièrement. Les souris traitées présentent un retard de la croissance tumorale jusqu'à J15 par rapport aux contrôles constitués par des animaux ayant reçu un virus MVA non recombinant. De plus, le traitement s'accompagne d'une régression partielle des tumeurs à J30-35 qui n'est pas observée lorsqu'on met en oeuvre un MVA équivalent exprimant les mutants E6\* et E7\* de localisation nucléaire native.

EXEMPLE 4 : Construction du virus recombinant VVTG5095 exprimant l'antigène E7\* de localisation transmembranaire.

20 Les séquences E7\*TMR sont isolées du M13TG9150 par digestion *BglII/BamHI* et insérées au site *BamHI* du pTG5016. La construction résultante, dénommée pTG5095, contient les séquences E7\* fusionnées aux signaux de sécrétion et d'ancrage de la glycoprotéine rabique, sous contrôle du promoteur p7.5. Le virus VVTG5095 est généré par recombinaison homologue avec le génome vaccine.

EXEMPLE 5 : Construction du virus recombinant VVTG6002 exprimant l'antigène E7\* de localisation transmembranaire et l'immunostimulateur B7.1.

30

Le gène B7.1 humain est isolé à partir d'une lignée cellulaire humaine Daudi par PCR reverse (RT-PCR) à l'aide des amorces oTG6353 et oTG6352 (SEQ ID NO: 22 et 23) et inséré entre les sites *Bgl*II et *Eco*RI de M13TG6131. On obtient M13TG9149 dont on isole le fragment *Bgl*II-*Eco*RI lequel est sous cloné entre les  
5 mêmes sites de M13TG5107, en 3' du promoteur p7.5 (M13TG5107 porte les séquences promotrices p7.5 clonées dans le site *Bam*HI du M13TG130). La cassette p7.5-B7.1 est isolée de la construction ainsi obtenue dénommée M13TG9152 par digestion *Eco*RI/*Pst*I et introduite dans le site *Eco*RI de pTG5095 à l'aide de l'oTG1086 (5'AATTGCA3'). La construction résultante est dénommée pTG6002  
10 et les virus recombinants VVTG6002 sont produits par recombinaison homologue avec le génome de la vaccine.

Une construction équivalente est réalisée par insertion des cassettes d'expression des gènes E7\* et B7.1 dans la zone d'excision III du génome MVAN33 selon la même technologie que celle développée à l'exemple 2.

15

EXEMPLE 6 : Efficacité *in vivo* des virus VVTG5095 et VVTG6002 (immunoprophylaxie).

Des souris C57BL6 ont été vaccinées à trois reprises par voie sous-cutanée  
20 avec  $10^7$  pfu de VVTG5095 ou VVTG6002. Trois jours après la dernière immunisation, ces animaux sont éprouvés avec  $10^3$  cellules E7W1 implantées en sous-cutané. A titre indicatif, les cellules E7W1 proviennent d'une lignée de lymphome murin transfectée par un vecteur exprimant le gène E7 oncogène de HPV-16. Le pourcentage de survie des animaux en fonction du temps est comparé  
25 à celui obtenu avec des souris témoins traitées avec  $10^7$  pfu d'un virus de la vaccine non recombinant VVTG186 (dérivé du vecteur TG186 décrit ci-dessus). Le suivi de la mortalité montre une différence entre les trois groupes. Alors que dans le groupe témoin 100 % des animaux sont morts à J36, on observe la survie d'environ un quart des animaux vaccinés par VVTG5095. La protection est sensiblement améliorée  
30 avec la construction VVTG6002 qui inclut les séquences codant pour l'antigène

B7.1.

EXEMPLE 7: Construction de MVATG9936 exprimant les gènes précoces modifiés et les gènes tardifs de HPV16.

5

Les fragments codant pour les protéines L1 et L2 de HPV16 sont isolés par PCR à partir d'ADN génomique de cellules Caski (ATCC 1550) selon les techniques générales de l'art. Le fragment d'amplification portant les séquences L1 est sous cloné dans M13TG130 (Kieny et al., 1983, Gene 26, 91-99), pour donner la construction M13TG8171. La séquence du gène L1 cloné révèle plusieurs mutations par rapport à la séquence contenue dans Genbank (accession K02718) : C à la place d'un A en position 248, C à la place d'un A en position 253, G à la place d'un A en position 537, G à la place d'un C en position 682, G à la place d'un A en position 874, insertion d'un triplet ACT' en position 1393, délétion d'un triplet GAT en position 1390. La séquence est corrigée par mutagenèse ponctuelle de manière à la rendre conforme à celle publiée par Zhou et al. (1991, Virology 185, 251-257) et introduire des mutations silencieuses au niveau des séquences TTTTNT qui constituent des sites potentiels de terminaison de la transcription précoce susceptibles d'interférer avec la phase précoce de développement de la vaccine. La technique de mutagenèse dirigée est à la portée de l'homme de l'art. Le vecteur portant la séquence corrigée est désigné M13TG4041.

L'insertion du fragment PCR portant les séquences L2 dans le vecteur M13TG6131 conduit à M13TG9126. On dénombre 5 mutations ponctuelles par rapport à la séquence divulguée dans Genbank : C à la place d'un T en position 378, A à la place d'un G en position 691, A à la place d'un G en position 702, G à la place d'un A en position 990 et C à la place d'un A en position 1092. A titre indicatif, le vecteur M13TG6131 dérive de M13TG131 (Kieny et al., 1983, Gene 26, 91-99) par mutation du site *Bgl*II interne situé en dehors des sites multiples de clonage.

Le vecteur M13TG4041 est digéré par *Xba*I-*Sac*I et le fragment portant les séquences L1 est inséré entre les sites *Xba*I-*Sac*I de M13TG9126 en aval du gène

L2 et en direction opposée. La construction ainsi générée est dénommée M13TG4042. Puis, les séquences L1 et L2 sont isolées par digestion *Bgl*II et sous clonées entre les sites *Bgl*II et *Bam*HI du vecteur M13TG4052 contenant le promoteur synthétique p11K7.5, qui résulte de la fusion des promoteurs tardif p11K et précoce p7.5. Des deux orientations, on sélectionne celle qui place le gène L1 en aval du promoteur, qui est désignée M13TG4055. Puis, la cassette d'expression portant le promoteur pH5R et le gène hIL-2, est isolée de pTG8042 par digestion *Hind*III avant d'être introduite dans le site *Hind*III de M13TG4055 situé entre les gènes L1 et L2. Enfin, la construction obtenue, M13TG4057, est digérée par *Bgl*II et le fragment portant les séquences tardives de HPV16 est inséré dans le site *Bam*HI de M13TG4060, lequel résulte du clonage du promoteur synthétique p4BK1L. Ce dernier est un promoteur hybride entre le promoteur précoce p4B (Davidson et Moss, 1989, J. Mol. Biol. 210, 749-769) et tardif pK1L (Davidson et Moss, 1989, J. Mol. Biol. 210, 771-784). On obtient M13TG4062 qui comprend le gène L1 sous le contrôle de p11K7.5, la cassette pH5R-IL2 et le gène L2 sous le contrôle de p4BK1L en orientation reverse par rapport aux séquences L1.

On construit une cassette polycistronique contenant les séquences codant pour E7\*TMR et pour E6\*TMF. En premier lieu, les séquences IRES du virus EMC (encephalomyocardiovirus ; Genbank accession M22458) sont isolées par les techniques conventionnelles sous forme d'un fragment *Eco*RI-*Nco*I introduit en aval du gène E7\*TMR entre les sites *Eco*RI et *Nco*I de pTG6002 (exemple 5), pour donner pTG8084. Puis le gène E6\*TMF est amplifié par PCR à l'aide d'amorces appropriées créant un site *Nco*I à son extrémité 5'. Le fragment *Bgl*II-*Nco*I portant le gène E7\*TMR et les séquences IRES obtenu de pTG8084 et le fragment PCR portant le gène E6\*TMF digéré par *Nco*I et *Sac*I sont réassemblés dans le vecteur M13TG6131 (exemple 2) préalablement digéré par *Bgl*II et *Sac*I. On obtient M13TG4059. Puis le bloc E7\*TMR-IRES-E6\*TMF est isolé de ce dernier sous forme d'un fragment *Bgl*II et inséré dans le site *Bam*HI de pTG8093 en aval du promoteur p7.5K. (pTG8093 résulte du clonage du promoteur p7.5K dans le vecteur pTG6025. La construction ainsi obtenue est désignée pTG9901.

Le fragment *SacI* de M13TG4062 est cloné dans le site *SacI* de pTG9901, pour donner pTG9902. Le gène de sélection *gpt* (Falkner et Moss, 1988, J. Virol. 62, 1849-1854) est assemblé avec les gènes tardifs et IL2 dans le vecteur p poly II (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201) de la façon suivante. Le premier est isolé de  
 5 M13TG4076 (ce vecteur contient le gène *gpt* flanqué à ses deux extrémités des séquences promotrices p4BK1L) par digestion *BglII-NcoI* et les seconds de pTG9902 par digestion *NcoI-SacI*. Les fragments purifiés sont clonés entre les sites *BglII-SacI* de p poly II. On obtient pTG9933 duquel on isole le fragment *SacI* qui est introduit dans le vecteur pTG9901 clivé par *SacI*. La construction ainsi obtenue  
 10 pTG9936 est illustrée à la Figure 2.

Les virus MVATG9936 sont générés par recombinaison homologue avec le génome MVAN33. L'isolement de clones peut être réalisé selon les règles de l'art.

#### EXEMPLE 8: Efficacité des virus en immunoprophylaxie.

15

##### *A. Importance de la formulation des virus (expérience N121)*

Le but de cette étude préclinique est de comparer la souche virale (virus de la vaccine Copenhagen contre MVA) et la formulation (présentation  
 20 transmembranaire contre localisation nucléaire native) en terme de protection anti-tumorale.

Des souris C57Bl6 sont vaccinées à trois reprises avec  $10^7$  pfu de virus. Les injections sont faites tous les dix jours (J1, J11 et J21) par voie intrapéritonéale. Les animaux sont éprouvés 7 jours après la dernière immunisation par administration  
 25 sous-cutanée dans leur flanc droit de  $5 \times 10^4$  cellules TC1. Huit groupes de 20 animaux sont constitués en fonction du virus ou de la solution administré, respectivement :

- 1 MVATG8042 (exemple 2, E6\*TMF, E7\*TMR, IL-2),
- 2 MVATG6037 (exemple 5, E7\*TMR, B7.1),
- 30 3 VVTG5095 (exemple 4, E7\*TMR),

- 4 MVATG6090 (E6\*, E7\*, IL-2),  
5 VVTG5061x188 (E6\*, E7\*, IL-2),  
6 VVTG186 (virus de la vaccine non recombinant),  
7 MVAN33 (virus MVA non recombinant), et  
5 8 une solution saline (PBS).

Les groupes 1 à 3 sont vaccinés avec les virus de la présente invention exprimant au moins un antigène HPV transmembranaire alors que les groupes 4 et 5 ont reçu des virus exprimant les antigènes précoces de HPV16 de localisation nucléaire native et les groupes 6 à 8 des virus contrôles non recombinants ou une  
10 solution saline. On indique que les virus MVATG6090 et VVTG5061x188 sont décrits dans la demande internationale WO98/04705. Le pourcentage de survie des animaux des différents groupes est suivi pendant les 12 semaines qui suivent l'épreuve tumorale. Les résultats peuvent être résumés de la façon suivante.

D'une manière générale, la mortalité est importante dans les trois groupes  
15 témoins atteignant 95% (avec les virus MVAN33 et VV186) et 81% (avec le PBS).

On observe un accroissement significatif de la survie des animaux immunisés avec les virus exprimant les antigènes nucléaires de HPV. Ainsi, 55% des souris ayant reçu le virus MVATG6090 sont libres de tumeurs alors que l'administration de VVTG5061x188 induit un taux de réjection tumorale de 75%.

20 En revanche, la grande majorité des animaux vaccinés avec les virus exprimant les antigènes transmembranaires de HPV16 ont rejetés leur tumeur ou présentent un retard de croissance tumorale important. Plus précisément, on observe 100% de rejection avec MVATG8042, 95% avec MVATG6037 et 90% avec VVTG5095.

25 La Figure 3 présente les courbes de survie obtenues avec les animaux vaccinés avec MVATG8042 et MVATG6090 par rapport aux contrôles (MVAN33 et PBS).

Dans leur ensemble, ces données mettent en évidence l'absence de différence  
significative entre les virus issus d'un virus de la vaccine Copenhagen et d'un MVA  
30 et la meilleure immunogénécité conférée par la présentation membranaire. De tous

les virus testés, le virus MVATG8042 est le plus efficace puisqu'il donne lieu à 100% de réjection tumorale dans ce modèle animal d'immunoprophylaxie.

*B. Etude de la réponse mémoire (expérience N122)*

5

Les souris C57Bl6 sont immunisées par voie intrapéritonéale avec  $10^7$  pfu de virus à J1, J11 et J21 avant d'être éprouvées à J82 par administration sous-cutanée dans leur flanc droit de  $5 \times 10^4$  cellules TC1. Huit groupes identiques à l'expérience précédente (N121) sont constitués. L'évolution des tumeurs est suivie en fonction du temps. Les données obtenues 50 jours après l'épreuve tumorale confirment que le virus le plus efficace en terme de réjection tumorale est le virus MVATG8042. Son administration protège 100% des animaux, indiquant sa capacité à induire une immunité à long terme.

15 *C. Effet de dose (expérience N127).*

Les souris C57Bl6 sont immunisées par voie intrapéritonéale à J1, J11 et J21 avec  $10^5$ ,  $10^6$  ou  $10^7$  pfu de virus MVATG8042 avant d'être éprouvées à J28 par administration sous-cutanée dans leur flanc droit de  $5 \times 10^4$  cellules TC1. Les animaux contrôles reçoivent des quantités identiques de MVAN33. L'évolution des tumeurs est suivie deux fois par semaine pendant 12 semaines. Les résultats (Figure 4) montrent 100% de protection quelle que soit la dose de MVATG8042 administrée alors que la grande majorité des animaux témoins développent des tumeurs. Ces données confirment l'efficacité du virus MVATG8042 même à faible dose.

*D. Effet de la voie d'administration (expérience N134).*

Les souris C57Bl6 sont immunisées par différentes routes d'administration

(scarification, sous-cutanée, intrapéritonéale ou intramusculaire) à J1, J11 et J21 avec  $10^7$  pfu de virus avant d'être éprouvées à J44 par administration sous-cutanée dans leur flanc droit de  $5 \times 10^4$  cellules TC1. L'évolution des tumeurs est suivie deux fois par semaine pendant 12 semaines. Comme montré à la Figure 5, les voies intrapéritonéale ou intramusculaire donnent les taux de protection les plus élevés avec le virus MVATG8042.

EXEMPLE 9: Efficacité des virus en immunothérapie.

10 A. *Efficacité des virus dans un contexte d'immunothérapie (expérience N125).*

Le but de cette étude est de comparer les capacités thérapeutiques à l'égard d'une tumeur préétablie des virus présentant les antigènes HPV sous une forme membranaire ou nucléaire. Pour ce faire,  $5 \times 10^4$  cellules TC1 sont administrées par voie sous-cutanée dans le flanc droit des souris C57Bl6 (J0). Puis,  $10^7$  pfu de virus sont injectés par voie intrapéritonéale à J7, J14 et J21. Quatre groupes d'animaux sont constitués selon le virus administré : respectivement MVAN33 (contrôle négatif), une solution saline de Tris-HCl/NaCl (contrôle négatif), MVATG8042 (formulation transmembranaire) et MVATG6090 (formulation nucléaire). L'évolution des tumeurs est évaluée deux fois par semaine pendant 12 semaines. Les résultats montrent une meilleure efficacité de la présentation membranaire en terme de protection anti-tumorale dans un contexte thérapeutique. 100% des souris ayant reçu MVATG8042 ont survécu 140 jours après l'implantation des cellules tumorales alors que le pourcentage est d'environ 60% pour les animaux injectés avec MVATG6090 et bien inférieur pour les animaux contrôles.

B. *Etudes de toxicité - Effet de la dose.*

Il est important de vérifier l'absence de virulence des virus avant d'envisager



leur application aux tumeurs humaines. On administre à des souris nude (5 animaux/groupe)  $10^6$  ou  $10^7$  pfu de virus MVATG8042, MVAN33 ou un virus de la vaccine Copenhagen sauvage (VVwt) par voie intracraniale. La survie des souris est suivie pendant 20 jours.

5 et les résultats présentés dans le tableau 1 suivant

Tableau 1

virus	Nombre de souris nude survivantes	
	$10^6$ pfu	$10^7$ pfu
MVAN33	5/5	5/5
MVATG8042	5/5	5/5
VVwt	-	0/5

Aucun effet secondaire n'est détecté suite à l'administration intracraniale de

10  $10^7$  pfu du virus MVATG8042 alors que toutes les souris traitées avec le virus de la vaccine sauvage sont mortes trois jours après l'injection. Le virus MVA contrôle n'est pas non plus toxique pour les animaux, ce qui confirme son atténuation par rapport au virus de la vaccine déjà décrite dans la littérature.

Revendications

1. Composition antitumorale comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un ou plusieurs polypeptide(s) immunogène(s), caractérisée en ce  
5 que l'un au moins desdits polypeptides est modifié de manière à présenter une localisation différente de sa localisation native.
2. Composition antitumorale selon la revendication 1, caractérisée en ce que la  
10 modification du polypeptide est obtenue par l'introduction de signaux de localisation appropriés et/ou la délétion ou l'inactivation des signaux de localisation natifs.
3. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 ou 2, dans laquelle le  
15 polypeptide immunogène ayant naturellement une localisation non membranaire, notamment nucléaire, est modifié de manière à présenter une localisation membranaire.
4. Composition antitumorale selon la revendication 3, dans laquelle le polypeptide  
20 immunogène est modifié par insertion d'une séquence d'ancrage membranaire et, le cas échéant, d'une séquence de sécrétion.
5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le polypeptide est délété de sa séquence de localisation nucléaire.
- 25 6. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 à 5, dans laquelle la séquence de sécrétion et/ou d'ancrage membranaire est sélectionnée parmi le groupe constitué par celle de la glycoprotéine rabique, de la glycoprotéine env du virus HIV et de la protéine F du virus de la rougeole.
- 30 7. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1, 2 ou 5, dans laquelle

le polypeptide immunogène est modifié de manière à présenter une localisation cytoplasmique, notamment par mutation/délétion des signaux de localisation natifs.

- 5      8. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1, 2 ou 5, dans laquelle le polypeptide immunogène est modifié par insertion, notamment à son extrémité C-terminale d'une séquence permettant une localisation dans un compartiment cellulaire particulier.
- 10     9. Composition antitumorale selon la revendication 8, dans laquelle le polypeptide immunogène est modifié par insertion, notamment à son extrémité C-terminale d'une séquence d'endocytose et, en particulier, de la séquence IPNYRNM.
- 15     10. Composition antitumorale selon la revendication 8, dans laquelle le polypeptide immunogène est modifié par insertion, notamment à son extrémité C-terminale d'une séquence permettant un ancrage dans la membrane de l'appareil de Golgi.
- 20     11. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 à 10, dans laquelle le polypeptide immunogène est originaire d'une région précoce et/ou tardive d'un papillomavirus et, notamment d'un papillomavirus humain (HPV) de type 16, 18, 31, 33 ou 45.
- 25     12. Composition antitumorale selon la revendication 11, dans laquelle le polypeptide immunogène dérive d'un polypeptide de la région précoce d'un papillomavirus et, notamment de E6 ou E7.
- 30     13. Composition antitumorale selon la revendication 12, dans laquelle le polypeptide immunogène dérive d'un variant non oncogène dudit polypeptide E6 ou E7 d'un papillomavirus.

14. Composition antitumorale selon la revendication 11, dans laquelle le polypeptide immunogène dérive du polypeptide L1 ou L2 d'un papillomavirus.
15. Composition antitumorale selon l'une des revendications 11 à 14, comprenant au moins un polypeptide immunogène dérivant d'un polypeptide précoce et au moins un polypeptide immunogène dérivant d'un polypeptide tardif d'un papillomavirus.
16. Composition antitumorale selon l'une des revendications 11 à 15, comprenant:
- (1) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1,
  - (2) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
  - (3) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1 et un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
  - (4) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus,
  - (5) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus, ou
  - (6) un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, un

polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus.

- 5     17. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 à 16, comprenant en outre au moins un composé améliorant l'effet antitumoral de ladite composition.
18. Composition antitumorale selon la revendication 17, dans laquelle ledit composé est un immunostimulateur.
- 10     19. Composition antitumorale selon la revendication 18, dans laquelle ledit composé immunostimulateur est sélectionné parmi le groupe constitué par l'interleukine-2, l'interleukine-7, l'interleukine-12 et les molécules de co-adhésion B7.1 et B7.2.
- 15     20. Composition antitumorale qui comprend à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique au moins un vecteur recombinant comprenant les séquences codant pour un ou plusieurs polypeptide(s) immunogène(s), l'un au moins desdits polypeptides étant modifié de manière à présenter une localisation différente de sa localisation native et, éventuellement, pour un composé améliorant l'effet
- 20     antitumoral de ladite composition.
21. Composition antitumorale selon la revendication 20, dans laquelle lesdits polypeptides immunogènes et améliorant l'effet antitumoral ont les caractéristiques telles que définies à l'une quelconque des revendications 1 à 19.
- 25     22. Composition antitumorale selon la revendication 20 ou 21, dans laquelle le vecteur recombinant dérive d'un poxvirus et notamment d'un virus de la vaccine, d'un canaripox et d'un fowlpox.
- 30     23. Composition antitumorale selon la revendication 22, dans laquelle le vecteur

recombinant dérive d'un virus de la vaccine sélectionné parmi les souches Copenhague, Wyeth et Ankara modifiée (MVA).

- 5 24. Composition antitumorale selon la revendication 23, dans laquelle le vecteur recombinant dérive d'un virus de la vaccine de la souche Copenhague et les séquences codant pour le ou lesdits polypeptides sont insérées au niveau du locus TK et/ou K1L dudit virus de la vaccine.
- 10 25. Composition antitumorale selon la revendication 23, dans laquelle le vecteur recombinant dérive d'un virus de la vaccine de la souche MVA et les séquences codant pour le ou lesdits polypeptides sont insérées au niveau de l'une au moins des zones d'excision I à VI dudit virus de la vaccine et, notamment II et/ou III.
- 15 26. Composition antitumorale selon l'une des revendications 22 à 25, dans laquelle les séquences codant pour le ou lesdits polypeptides sont placées sous le contrôle d'un promoteur d'un gène d'un virus de la vaccine et, notamment d'un promoteur sélectionné parmi les promoteurs des gènes thymidine kinase (TK), 7,5K, H5R p28, p11 et K1L.
- 20 27. Composition antitumorale selon l'une des revendications 22 à 26, destinée au traitement ou la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus, comprenant au moins un vecteur recombinant dérivé d'un virus de la vaccine de la souche Copenhague ou MVA dans lequel sont insérées :
- 25 (1) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1,
- (2) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
- 30 (3) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une

- séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1 et pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
- 5       (4)    les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus,
- 10       (5)    les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus, ou
- 15       (6)    les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, pour un polypeptide immunogène dérivant de
- 20       la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus.

28. Composition antitumorale selon la revendication 27, comprenant en outre les séquences codant pour un composé immunostimulateur, de préférence, choisi

25       parmi L'IL-2 ou B7.1.

29. Composition antitumorale selon l'une des revendications 20 à 28, dans laquelle le vecteur recombinant est vivant ou tué.

30    30. Composition antitumorale selon l'une des revendications 1 à 29, comportant un

support acceptable d'un point de vue pharmaceutique permettant son administration par injection à l'homme ou à l'animal.

31. Vecteur recombinant comprenant au moins les séquences codant pour un polypeptide immunogène originaire d'une région précoce et/ou tardive d'un papillomavirus, ledit polypeptide ayant les caractéristiques définies aux revendications 11 à 16.
32. Vecteur recombinant selon la revendication 31, comprenant en outre une ou plusieurs séquences codant pour un polypeptide d'intérêt, notamment un polypeptide immunogène et/ou un polypeptide immunostimulateur.
33. Vecteur recombinant selon la revendication 31 ou 32, dérivant d'un vecteur plasmidique ou viral, notamment d'un poxvirus et en particulier d'un virus de la vaccine de la souche Copenhague ou MVA.
34. Vecteur recombinant selon la revendication 33, dérivant d'un virus de la vaccine de la souche Copenhague ou MVA dans lesquels sont insérées :
- (1) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1,
  - (2) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
  - (3) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1 et pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2,
  - (4) les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une



- séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus,
- 5       (5)       les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus, ou
- 10       (6)       les séquences codant pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 1, pour un polypeptide immunogène ayant une séquence homologue ou identique à tout ou partie de celle montrée dans la SEQ ID NO: 2, pour un polypeptide immunogène dérivant de
- 15       la protéine L1 d'un papillomavirus et/ou pour un polypeptide immunogène dérivant de la protéine L2 d'un papillomavirus.
35. Particule virale comprenant un vecteur recombinant selon l'une des revendications 31 à 34.
- 20
36. Particule virale selon la revendication 35, dans laquelle ledit polypeptide immunogène est ancré dans la structure protéique entourant ladite particule virale.
37. Utilisation d'une composition antitumorale selon l'une des revendications 1 à 30,
- 25       d'un vecteur recombinant selon l'une des revendications 31 à 34 ou d'une particule virale selon la revendication 35 ou 36, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'un cancer ou d'une tumeur.
38. Utilisation selon la revendication 37, pour la préparation d'un médicament destiné
- 30       au traitement ou à la prévention d'un cancer du col de l'utérus, d'une dysplasie du

col de bas grade et d'une infection à papillomavirus.

39. Utilisation selon la revendication 37 ou 38, pour la préparation d'un médicament injectable par la voie intramusculaire.

5

1/5

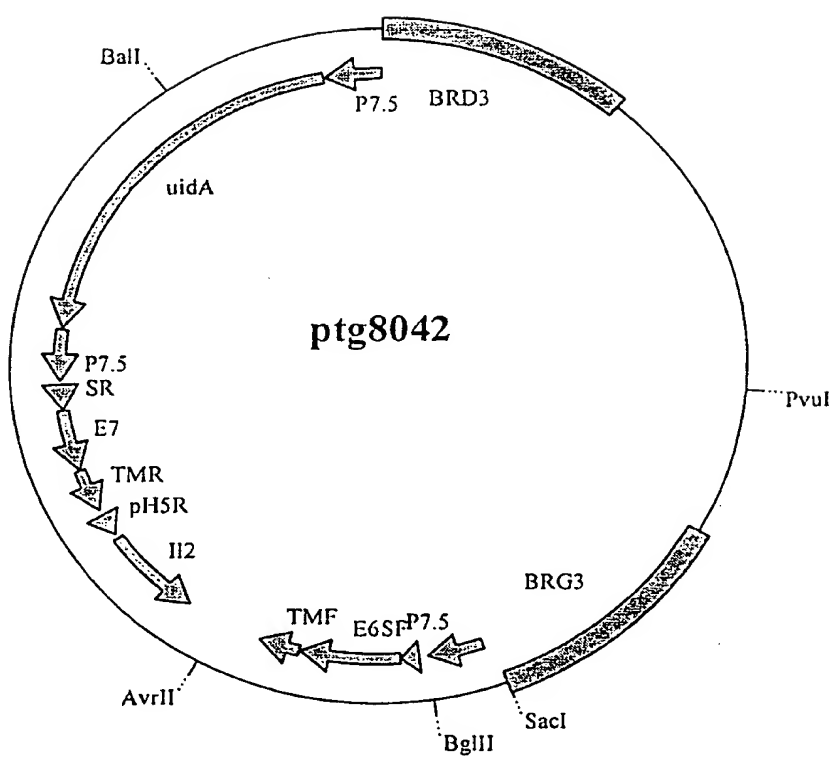


Figure 1

2/5

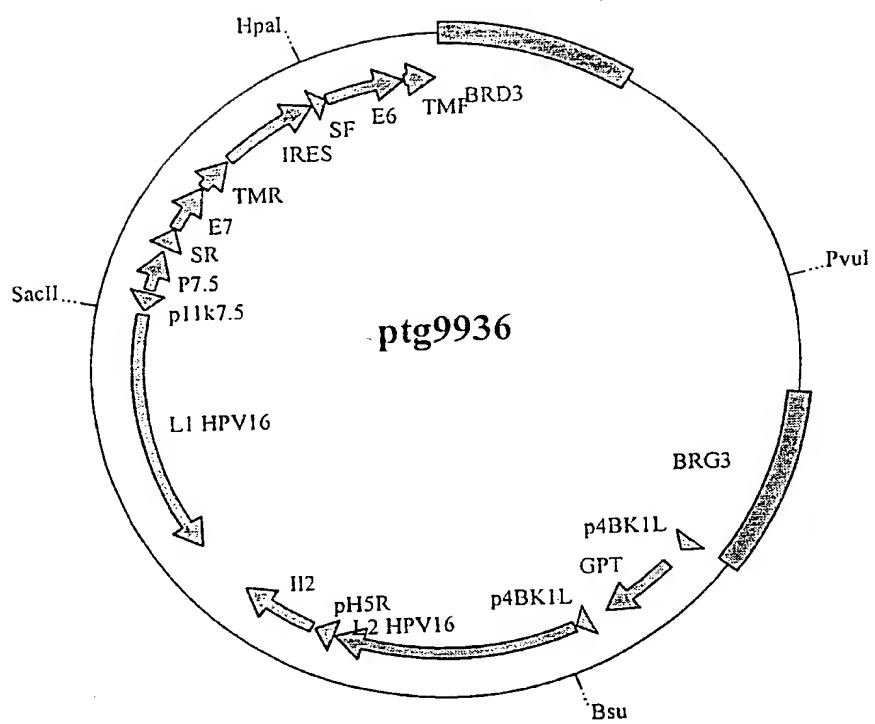


Figure 2

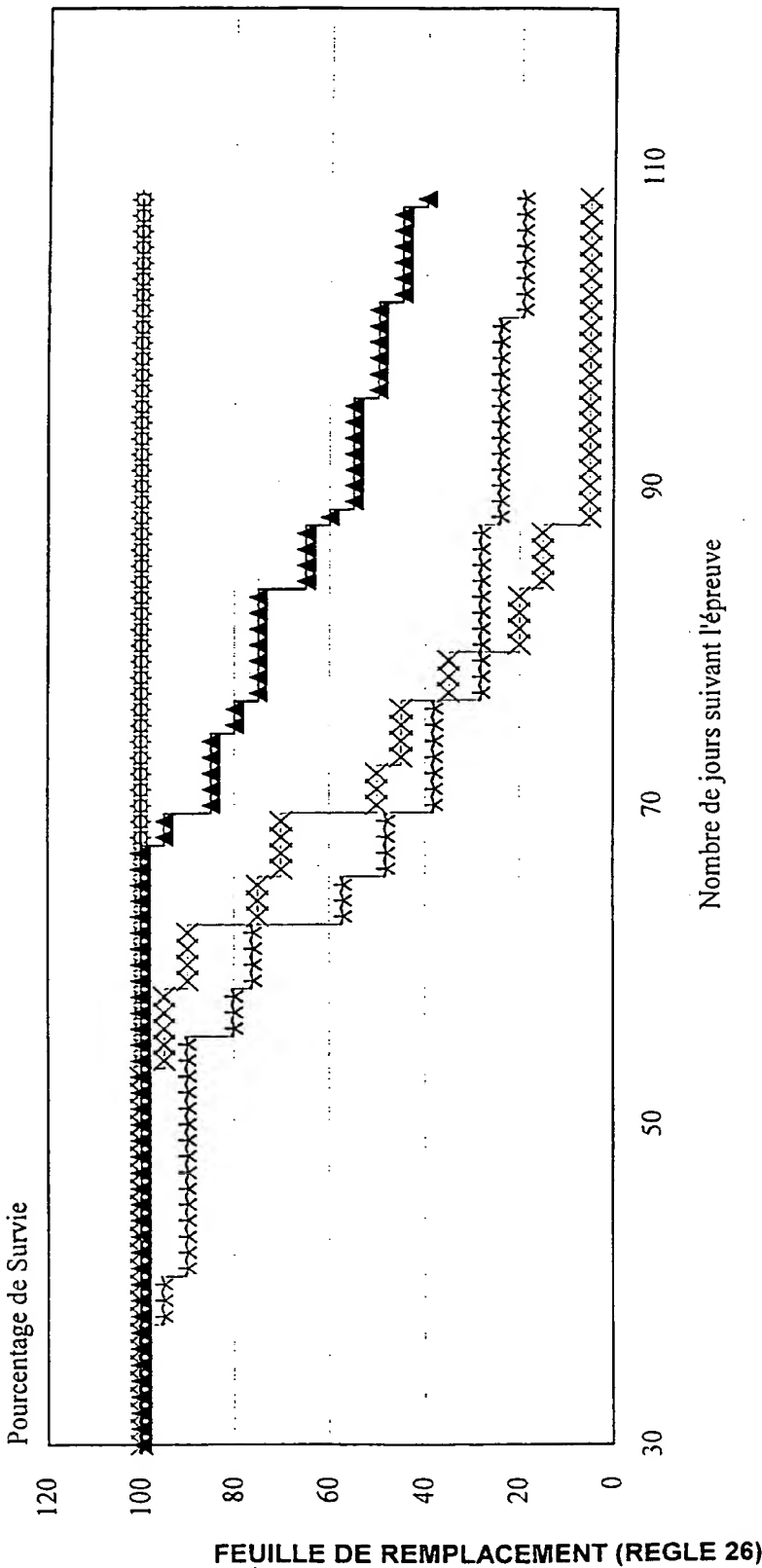


Figure 3

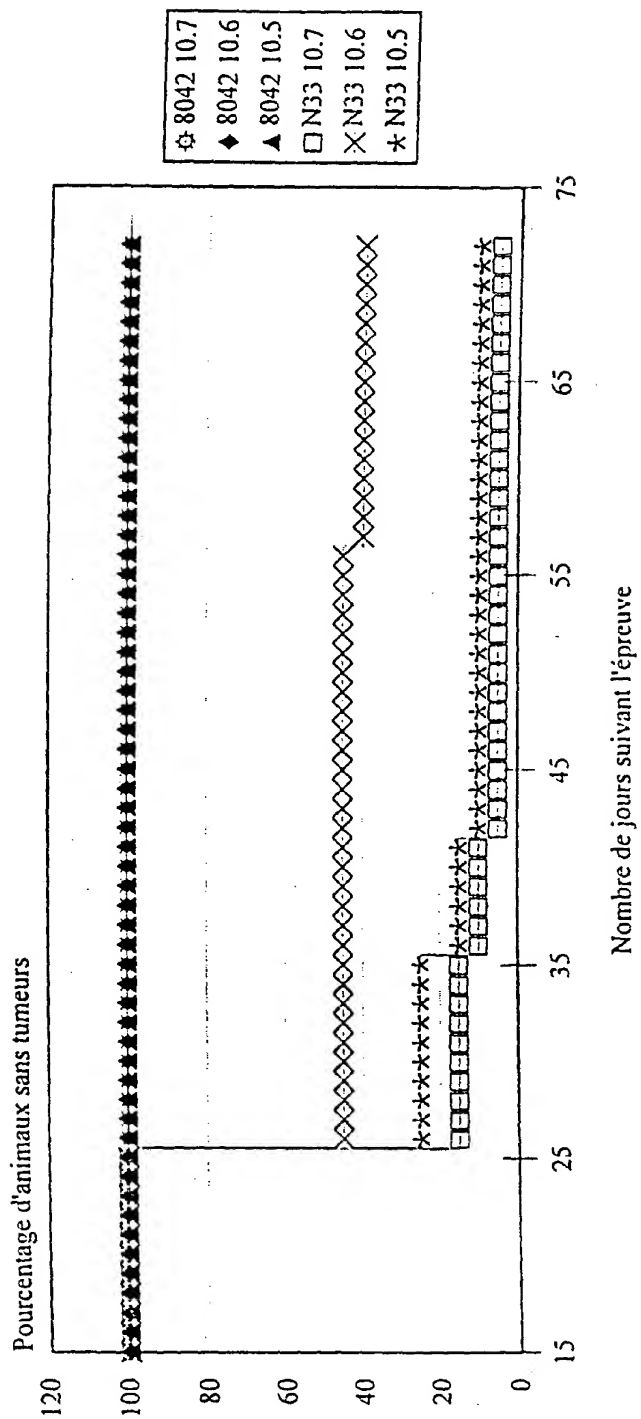


Figure 4

5/5

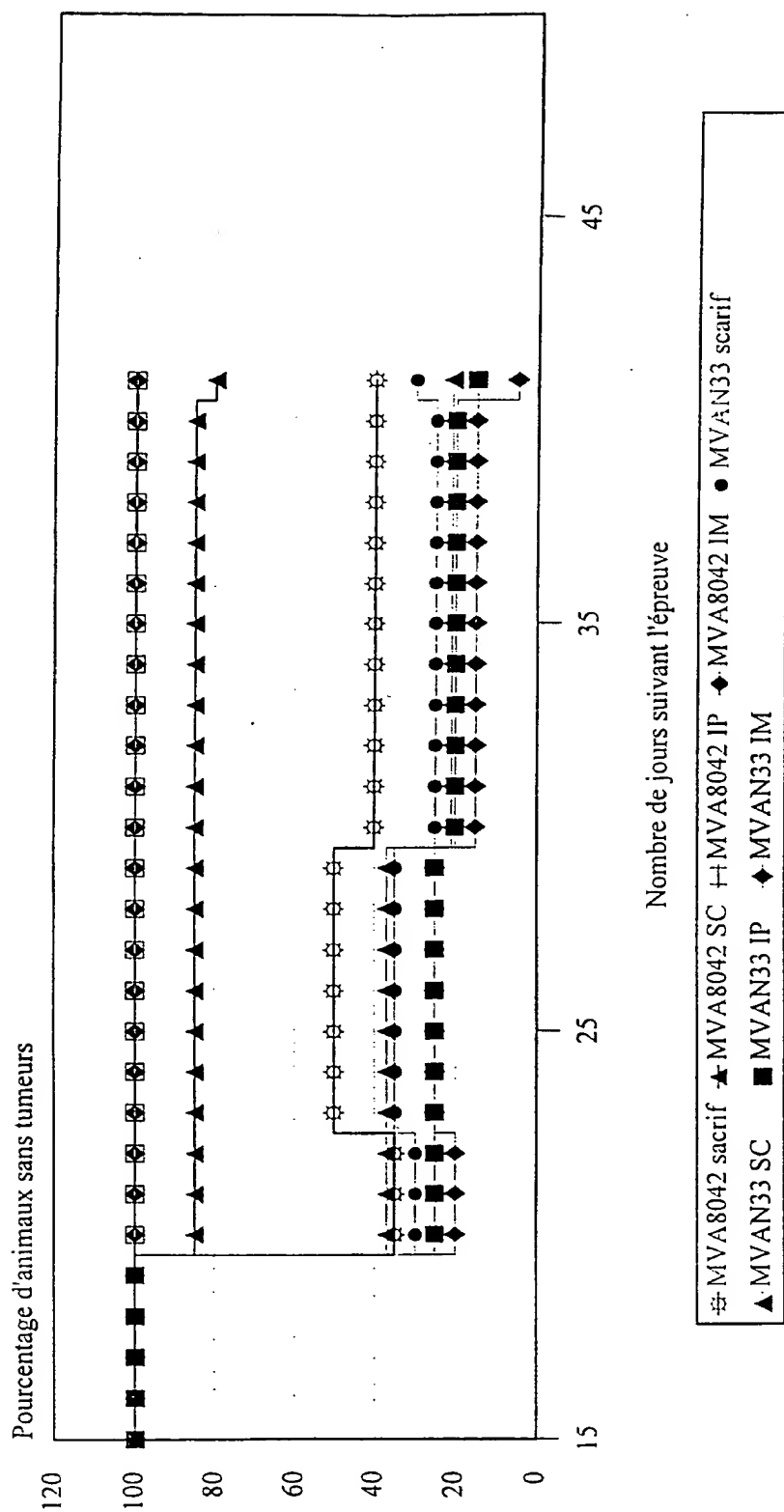


Figure 5

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

- (i) DEPOSANT:
  - (A) NOM: Transgene SA
  - (B) RUE: 11 rue de Molsheim
  - (C) VILLE: Strasbourg
  - (E) PAYS: France
  - (F) CODE POSTAL: 67082
  - (G) TELEPHONE: (33) 03 88 27 91 00
  - (H) TELECOPIE: (33) 03 88 27 91 11
- (ii) TITRE DE L' INVENTION: composition antitumorale a base de polypeptide immunogene de localisation cellulaire modifiee.
- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 23
- (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:
  - (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
  - (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
  - (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 243 acides aminés
  - (B) TYPE: acide aminé
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Human papillomavirus
  - (B) SOUCHE: HPV-16
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: proteine E6 fusionnee signaux de la proteine F
- (vii) SOURCE IMMEDIATE:
  - (B) CLONE: E6\*TMF

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

```

Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala Val Leu Leu
 1           5           10           15

Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Met His Gln Lys
 20           25           30

Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro
 35           40           45

Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu
 50           55           60

```



2

Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe  
 65 70 75 80  
 Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala  
 85 90 95  
 Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg  
 100 105 110  
 His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn  
 115 120 125  
 Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro  
 130 135 140  
 Leu Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly  
 145 150 155 160  
 Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg  
 165 170 175  
 Arg Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ser Ser Thr Ser Ile Val Tyr Ile Leu  
 180 185 190  
 Ile Ala Val Cys Leu Gly Gly Leu Ile Gly Ile Pro Ala Leu Ile Cys  
 195 200 205  
 Cys Cys Arg Gly Arg Cys Asn Lys Lys Gly Glu Gln Val Gly Met Ser  
 210 215 220  
 Arg Pro Gly Leu Lys Pro Asp Leu Thr Gly Thr Ser Lys Ser Tyr Val  
 225 230 235 240  
 Arg Ser Leu

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 185 acides aminés
  - (B) TYPE: acide aminé
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: human Papillomavirus
  - (B) SOUCHE: HPV-16
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: E7 fusionne signaux de la glycoprotéine rabique
- (vii) SOURCE IMMEDIATE:
  - (B) CLONE: E7\*TMR

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu  
 1 5 10 15  
 Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Gly Ser Met His Gly Asp Thr Pro Thr  
 20 25 30

## 3

```

Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Gln Leu Asn
   35                                40                                45

Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala
   50                                55                                60

Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys
   65                                70                                75                                80

Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg
   85                                90                                95

Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile
   100                                105                                110

Cys Ser Gln Lys Pro Arg Ser Tyr Val Leu Leu Ser Ala Gly Ala Leu
   115                                120                                125

Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Met Thr Cys Cys Arg Arg Val
   130                                135                                140

Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His Asn Leu Arg Gly Thr Gly Arg Glu
   145                                150                                155                                160

Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly Lys Ile Ile Ser Ser Trp Glu Ser
   165                                170                                175

His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu
   180                                185

```

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

## (iii) HYPOTHETIQUE: NON

## (iii) ANTI-SENS: OUI

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Human Papillomavirus
- (B) SOUCHE: HPV-16
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG5118  
(E7 delete 21 26)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TCTGAGCTGT CATTAAATTG AGTTGTCTCT GGTTC

36

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 42 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

4

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Rabies virus
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de mutagenese oTG5745

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

TGCACTCACT AATACATAGG ATCCAATAGG GAATTTCCCA AA

42

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 38 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG6390

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GTATCTCCAT GCATGGATCC TGCAGGGTTT CTCTACGT

38

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG6880

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GGATCCGCCA TGGTAGATCT TGGTTTCTGA GAACAG

36

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases

5

- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Rabies virus

(B) SOUCHE: HPV-16

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG5377  
(E6 delete 111 a 115)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

TGTCAGATG TCTTGCAGT GGCTTTTGAC AG

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 34 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: oligonucleotide de synthese oTG10829

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GCGCGCTCTA GAATTATGGG TCTCAAGGTG AACG

34

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 35 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: oligonucleotide de synthese oTG10830

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CAGTTCTCTT TTGGTGCATG CCCCAATGGA TTGA

35

6

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 38 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

- (B) SOUCHE: oligonucleotide de synthese oTG10835

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

ATGCTAGTGC TCGATAAACC CAGCTGGGTT TCTCTACG

38

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

## (vi) ORIGINE:

- (B) SOUCHE: oligonucleotide de synthese oTG10836

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

TCAAATCCAT TGGGGCATGC ACCAAAAGAG AACTG

35

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 38 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10833

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CGTAGAGAAA CCCAGCTGGG TTTATCGAGC ACTAGCAT

38

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10834

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

GCGGGCATGC GGTACCTCAG AGCGACCTTA CATAGG

36

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Vaccinia virus
  - (B) SOUCHE: Ankara modifie
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7637  
(PCR zone III)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

GGGGGGGAAT TCAGTAAACT TGAATAATC TT

32

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Vaccinia virus

8

- (B) SOUCHE: Ankara modifiée
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7638  
(PCR zone III)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

GGGGGGGGGAT CCGAGCTCAC CAGCCACCGA AAGAGCAAT

39

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Vaccinia virus
  - (B) SOUCHE: Ankara modifiée
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7635  
(PCR zone III)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

GGGGGGGGGAT CCGGAAAGTT TTATAGGTAG TT

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 17:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Vaccinia virus
  - (B) SOUCHE: Ankara modifiée
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7636  
(PCR zone III)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

GGGGGGGAAT TCTTTGTATT TACGTGAACG

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 18:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 77 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique

9

(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: oligonucleotide de synthese oTG10502

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

AGCTTTTAT TCTATACTTA AAAAATGAAA ATAAACTCGA GTTGTCAAAG CATCATCTCA

60

ACACTGACTT GAGGTAC

77

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 69 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: oligonucleotide de synthese oTG10503

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

CTCAAGTCAG TGTGAGATG ATGCTTTGAC AACTCGAGTT TATTTTCATT TTTAAGTAT

60

AGAATAAAA

69

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 39 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG5925

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

TCAGATCTGT CGAGGGATCT GCAGCTTCTT CTAGAGGTA

39



10

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 21:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 44 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG5924

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

AGTGAATTGC TGCAGGTACC CGGATCCGCA TCGACTATCG ACAT

44

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 22:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Homo sapiens
  - (B) SOUCHE: lignee cellulaire Daudi
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: amorce PCR oTG6353 (clonage B7.1)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

TCAGCCCCCTG AATTCTGCGG AACTGTTAT ACAGG

35

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 23:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Homo sapiens
  - (B) SOUCHE: lignee cellulaire Daudi
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: amorce PCR oTG6352 (clonage B7.1)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

TTGACCCTAA AGATCTGAAG CCATGGGCCA CAC

33

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No  
PCT/FR 98/01576

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C07K14/025 C12N15/86 A61K39/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 21680 A (US HEALTH) 29 September 1994 claims	1,2
Y	WO 93 00436 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH) 7 January 1993 claims	1-39
Y	BOURNELL M. ET AL.,: "Construction and characterisation of a recombinant vaccinia virus expressing human papillomavirus proteins for immunotherapy of cervical cancer" VACCINE, vol. 14, no. 16, - 1996 pages 1485-1494, XP002061738 see the whole document	1-39
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"3" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 November 1998

Date of mailing of the international search report

25/11/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No  
PCT/FR 98/01576

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category <sup>2</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MENEGUZZI G ET AL: "VACCINATION AGAINST PAPILLOMAVIRUS-INDUCED TUMORS USING VACCINIA RECOMBINANTS EXPRESSING NON-STRUCTURAL PROTEINS" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, no. SUP. 13, PART C, 1 January 1989, page 210 XP000121130 see the whole document ---	1-39
A	WO 87 06260 A (TRANSGENE SA ; PASTEUR INSTITUT (FR)) 22 October 1987 see the whole document ---	1-39
A	WO 87 07642 A (TRANSGENE SA ; PASTEUR INSTITUT (FR)) 17 December 1987 see the whole document ---	1-39
A	WO 90 10459 A (TRANSGENE SA) 20 September 1990 see the whole document ---	1-39
A	JARRETT W F H ET AL: "STUDIES ON VACCINATION AGAINST PAPILLOMAVIRUSES: PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC VACCINATION WITH RECOMBINANT STRUCTURAL PROTEINS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 184, 1991, pages 33-42, XP002023588 see the whole document ---	1-39
P,X	WO 97 27216 A (UNIV GEORGETOWN ; DAVIDSON EUGENE A (US); YANG SHUTONG (US)) 31 July 1997 see the whole document ---	1-3, 5, 20, 21, 29, 30
A	WO 96 39178 A (WISTAR INST ; UNIV PENNSYLVANIA (US); ERTL HILDEGUND C J (US); WILS) 12 December 1996 claims , seq id 2 ---	11-16, 27, 34-36
A	SEEDORF K ET AL: "HUMAN PAPILLONMAVIRUS TYPE 16 DNA SEQUENCE" VIROLOGY, vol. 145, no. 1, August 1985, pages 181-185, XP002059799 see the whole document -----	11-16, 27, 34-36

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/01576

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9421680 A	29-09-1994	AU 692152 B	04-06-1998
		AU 6410794 A	11-10-1994
		CA 2158455 A	29-09-1994
		EP 0689551 A	03-01-1996
		JP 8508252 T	03-09-1996
		US 5733548 A	31-03-1998
WO 9300436 A	07-01-1993	AU 662910 B	21-09-1995
		AU 1985992 A	25-01-1993
		EP 0592480 A	20-04-1994
		JP 6508988 T	13-10-1994
WO 8706260 A	22-10-1987	FR 2596771 A	09-10-1987
		FR 2606029 A	06-05-1988
		AU 604696 B	03-01-1991
		AU 7234987 A	09-11-1987
		DE 3789400 D	28-04-1994
		DE 3789400 T	01-09-1994
		DK 641787 A	07-12-1987
		EP 0245136 A	11-11-1987
		ES 2052589 T	16-07-1994
		JP 10059868 A	03-03-1998
		JP 2743164 B	22-04-1998
		JP 8224090 A	03-09-1996
		JP 1500161 T	26-01-1989
		JP 2719917 B	25-02-1998
		KR 9601819 B	05-02-1996
		PT 84640 B	30-11-1989
		US 5672689 A	30-09-1997
		US 5795577 A	18-08-1998
		US 5169763 A	08-12-1992
WO 8707642 A	17-12-1987	FR 2600079 A	18-12-1987
		AU 614934 B	19-09-1991
		AU 7514087 A	11-01-1988
		DE 3789525 D	11-05-1994
		DE 3789525 T	25-08-1994
		DK 76688 A	15-02-1988
		EP 0253693 A	20-01-1988
		ES 2062990 T	01-01-1995

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR 98/01576

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8707642 A		JP 1500962 T PT 85093 B	06-04-1989 30-03-1990
WO 9010459 A	20-09-1990	FR 2643817 A CA 2050304 A DE 69002325 T DK 462187 T EP 0462187 A ES 2058898 T JP 5503282 T US 5744133 A	07-09-1990 07-09-1990 02-12-1993 18-10-1993 27-12-1991 01-11-1994 03-06-1993 28-04-1998
WO 9727216 A	31-07-1997	AU 2248997 A	20-08-1997
WO 9639178 A	12-12-1996	US 5698202 A AU 6261696 A	16-12-1997 24-12-1996

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr Internationale No  
PCT/FR 98/01576

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 6 C07K14/025 C12N15/86 A61K39/12		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C07K C12N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 94 21680 A (US HEALTH) 29 septembre 1994 revendications	1,2
Y	WO 93 00436 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH) 7 janvier 1993 revendications	1-39
Y	BOURNELL M. ET AL.,: "Construction and caractérisation of a recombinant vaccinia virus expressing human papillomavirus proteins for immunotherapy of cervical cancer" VACCINE, vol. 14, no. 16, - 1996 pages 1485-1494, XP002061738 voir le document en entier	1-39
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
18 novembre 1998		25/11/1998
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Müller, F

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demi Internationale No

PCT/FR 98/01576

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MENEGUZZI G ET AL: "VACCINATION AGAINST PAPILLOMAVIRUS-INDUCED TUMORS USING VACCINIA RECOMBINANTS EXPRESSING NON-STRUCTURAL PROTEINS" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, no. SUP. 13, PART C, 1 janvier 1989, page 210 XP000121130 voir le document en entier ---	1-39
A	WO 87 06260 A (TRANSGENE SA ; PASTEUR INSTITUT (FR)) 22 octobre 1987 voir le document en entier ---	1-39
A	WO 87 07642 A (TRANSGENE SA ; PASTEUR INSTITUT (FR)) 17 décembre 1987 voir le document en entier ---	1-39
A	WO 90 10459 A (TRANSGENE SA) 20 septembre 1990 voir le document en entier ---	1-39
A	JARRETT W F H ET AL: "STUDIES ON VACCINATION AGAINST PAPILLOMAVIRUSES: PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC VACCINATION WITH RECOMBINANT STRUCTURAL PROTEINS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 184, 1991, pages 33-42, XP002023588 voir le document en entier ---	1-39
P,X	WO 97 27216 A (UNIV GEORGETOWN ; DAVIDSON EUGENE A (US); YANG SHUTONG (US)) 31 juillet 1997 voir le document en entier ---	1-3,5, 20,21, 29,30
A	WO 96 39178 A (WISTAR INST ; UNIV PENNSYLVANIA (US); ERTL HILDEGUND C J (US); WILS) 12 décembre 1996 revendications, seq id 2 ---	11-16, 27,34-36
A	SEEDORF K ET AL: "HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 DNA SEQUENCE" VIROLOGY, vol. 145, no. 1, août 1985, pages 181-185, XP002059799 voir le document en entier -----	11-16, 27,34-36



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem Internationale No

PCT/FR 98/01576

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9421680 A	29-09-1994	AU 692152 B	04-06-1998
		AU 6410794 A	11-10-1994
		CA 2158455 A	29-09-1994
		EP 0689551 A	03-01-1996
		JP 8508252 T	03-09-1996
		US 5733548 A	31-03-1998
WO 9300436 A	07-01-1993	AU 662910 B	21-09-1995
		AU 1985992 A	25-01-1993
		EP 0592480 A	20-04-1994
		JP 6508988 T	13-10-1994
WO 8706260 A	22-10-1987	FR 2596771 A	09-10-1987
		FR 2606029 A	06-05-1988
		AU 604696 B	03-01-1991
		AU 7234987 A	09-11-1987
		DE 3789400 D	28-04-1994
		DE 3789400 T	01-09-1994
		DK 641787 A	07-12-1987
		EP 0245136 A	11-11-1987
		ES 2052589 T	16-07-1994
		JP 10059868 A	03-03-1998
		JP 2743164 B	22-04-1998
		JP 8224090 A	03-09-1996
		JP 1500161 T	26-01-1989
		JP 2719917 B	25-02-1998
		KR 9601819 B	05-02-1996
		PT 84640 B	30-11-1989
		US 5672689 A	30-09-1997
		US 5795577 A	18-08-1998
		US 5169763 A	08-12-1992
WO 8707642 A	17-12-1987	FR 2600079 A	18-12-1987
		AU 614934 B	19-09-1991
		AU 7514087 A	11-01-1988
		DE 3789525 D	11-05-1994
		DE 3789525 T	25-08-1994
		DK 76688 A	15-02-1988
		EP 0253693 A	20-01-1988
		ES 2062990 T	01-01-1995

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem : Internationale No  
PCT/FR 98/01576

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 8707642 A		JP 1500962 T	06-04-1989
		PT 85093 B	30-03-1990
WO 9010459 A	20-09-1990	FR 2643817 A	07-09-1990
		CA 2050304 A	07-09-1990
		DE 69002325 T	02-12-1993
		DK 462187 T	18-10-1993
		EP 0462187 A	27-12-1991
		ES 2058898 T	01-11-1994
		JP 5503282 T	03-06-1993
		US 5744133 A	28-04-1998
WO 9727216 A	31-07-1997	AU 2248997 A	20-08-1997
WO 9639178 A	12-12-1996	US 5698202 A	16-12-1997
		AU 6261696 A	24-12-1996